Istituto d'Igiene della R. Università di Parma
Direttore: Prof. E. BERTARELLI

Vaccinazione antitubercolare e gravidanza

Ricerche sperimentali del Dott. GUIDO LEVI

Primo Assistente alla R. Maternità di Torino e libero docente in Ostetricia e Ginecologia

Estratto dagli Annali dell' Istituto Maragliano - Vol. IX. Fasc. III e IV

ARTI GRAFICHE G. SCHENONE - Genova

In rispettoso omaggio
G. Levi

Vaccinazione antitubercolare e Gravidanza

Ricerche sperimentali del Dott. GUIDO LEVI

Primo Assistente alla R. Maternità di Torino e libero docente in Ostetricia e Ginecologia

---

La questione della profilassi della tubercolosi, già di per sé, tanto importante, acquista speciale interesse, quando si collega alla funzione della maternità

Tra i diversi provvedimenti igienici e terapeutici, escogitati in epoche differenti, per proteggere l'esistenza umana contro il terribile morbo, quello della vaccinazione specifica, sorto in tempi a noi vicini, si è andato rapidamente imponendo all' attenzione degli studiosi. Fra le diverse ricerche sulla profilassi vaccinica contro il bacillo di Koch, alcune ebbero anche per oggetto lo studio della possibilità di trasmettere, attraverso la placenta, sostanze immunizzanti al feto, mediante la loro introduzione nell'organismo materno Però, solo nel 1914 De Blasi, nella Clinica di Bossi, contemporaneamente al dott. Boheme di Dresda che lavorava in questo senso nell'Istituto di Genova, dietro indirizzo del Prof Maragliano,

intraprese indagini sistematiche sulla possibilità di un' immunizzazione congenita contro la tubercolosi, e pochi altri dopo di lui, pubblicarono lavori sul medesimo argomento.

Data l'importanza della questione, mi parve non inutile praticare qualche altra ricerca nello stesso senso.

Prima di riferire i risultati delle mie prove, ricorderò per sommi capi le osservazioni più importanti, state finora eseguite sulla vaccinazione antitubercolare, fuori di gravidanza e durante lo stato puerperale.

NOTIZIE BIBLIOGRAFICHE

Vaccinazione antitubercolare fuori dello stato di gravidanza.

La vaccinazione antitubercolare è stata intrapresa per il primo da Maragliano che ne ha dato comunicazione nel 1903.

La vaccinazione antitubercolare presenta le stesse identiche ragioni scientifiche che creano il fondamento della immunizzazione nelle altre malattie infettive.

L'organismo animale di fronte ai materiali tubercolari che vengono introdotti in grembo ad esso produce, per questa stimolazione, un processo reattivo rappresentato da tutti quei principî specifici di difesa che vengono compresi sotto il nome di principî di reazione e di principî di difesa

Se si segue per un determinato periodo di tempo quello che avviene dei bacilli inoculati sotto cute coll'atto della vaccinazione, si può facilmente comprendere come l'organismo risenta lo stimolo dei principî tubercolari e come a questi esso risponda. Giova notare che di vaccini antitubercolari, dopo Maragliano, molti ne sono stati preparati, che anzi la tendenza di molti autori è quella di agire con vaccini costituiti da bacilli vivi o attenuati ma che a questa corrente sempre si oppose il clinico di Genova dimostrando da una parte il possibile danno che può derivare dall'uso di materiale tubercolare vivo e dall'altra la possibilità di ottenere con materiale morto, reazioni difensive sufficienti.

Tra *i vari tipi di vaccino*, proposti dai diversi ricercatori, i più noti sono costituiti o da bacilli vivi e virulenti o da bacilli a virulenza in vario modo attenuata o da bacilli uccisi, o da prodotti ottenuti dai bacilli con mezzi fisici o chimici di varia natura.

Nel campo della tubercolosi Behring, Guerrin, Calmette, Goupil, Smith, e molti altri pensano che i bacilli uccisi, con qualunque mezzo fisico o chimico, determinino nell'organismo un'immunità leggera e transitoria, e quindi insufficiente, qualunque sia la loro via d'introduzione.

Molti altri osservatori, invece, pur parteggiando per l'uso a scopo vaccinante di germi viventi, ne propongono la preventiva attenuazione, coi mezzi più svariati.

Troviamo perciò vaccini preparati con bacilli di specie non nociva per l'animale cui sono destinati, accanto a vaccini allestiti con bacilli modificati mediante agenti fisico-chimici, od attenuati con procedimenti biologici. Menzioniamo tra i primi, i bacilli della tartaruga di Friedmann, i bacilli bovini mescolati con quelli umani attenuati di Smith, il bovovaccino di Behring, il tauruman di Weber e Titze.

Tra i secondi ricordiamo i bacilli sottoposti all'azione dei raggi ultravioletti, o del radio (Milani) o del calore (Calmette e Guerin), o chiusi in sacchi di collodio (Heymans e Goggia), o distillati, o macerati in liquido di Gram riscaldato, oppure messi in contatto con composti di fluoro, o con idrato sodico ed acido oleico (Moeller e Wolff) o con lecitina, o con sostanze sgrassanti (Vallée).

Al terzo tipo appartengono i bacilli assoggettati al passaggio attraverso salamandra (Klimmer), od altri animali (Pearson e Gillaud), od autolisati, od introdotti in tessuti viventi (sottocutaneo, muscolare, nervoso, etc.), od elaborati da cellule speciali di tessuti viventi (Bruschettini), o trattati con sieri antibacillari, od anche con sieri antibacillari e complemento (bacilli sensibilizzati di Besredka)

Però in questi ultimi anni, come per altre infezioni, anche per la tubercolosi, ha perduto terreno il concetto che sia indispensabile impiegare germi vivi per la vaccinazione, e sono diventati sempre più numerosi i sostenitori della necessità di adoperare a tale scopo, bacilli uccisi.

Lo stesso Behring, in questi ultimi anni, è ritornato sui suoi primitivi convincimenti, ed ha riconosciuto l'utilità dei vaccini morti. E così Belfanti, Sclavo, Lignieres, e Much. Quest'ultimo vorrebbe però che si usassero materiali composti con alcune parti soltanto del bacillo tubercolare (antigeni parziali).

I vaccini che si adoprano attualmente a scopo profilattico ed anche curativo son tutti preparati con bacilli uccisi, o mediante il calore, o coll'etere o con altri mezzi fisico-chimici.

D'importanza puramente dottrinaria, sono i tentativi di vaccinazione fatti con prodotti organici capaci di agire come antigeni tubercolari, quali gli estratti di ghiandole linfatiche scrofolose umane, o di polmone umano tubercoloso (Romanelli e Morelli), o gli sputi disseccati di individui tubercolosi, o i sedimenti orinari pure di tubercoloso, opportunamente trattati.

Un'altra questione, legata alla precedente e tuttora controversa, è quella della maggior o minor convenienza di adoperare a scopo vaccinante *bacilli rapidamente assorbibili*, piuttosto che *germi* capaci di passar solo *lentamente* e *gradualmente* nell'organismo. Anche a questo proposito la maggioranza degli osservatori, e cito tra questi Maragliano primo sostenitore e Vallée, pro pende per la seconda soluzione, preconizzando perciò, oltre l'uso di bacilli morti invece che viventi, anche la loro introduzione *sottocute* invece che profondamente nei *muscoli* oppure nello *stomaco*, o nel *retto*, o nelle *vene*

Per la tubercolosi, Ghedini, Costantini, Lucciarini, studiando la *sorte dei cadaveri di bacilli* uccisi all'autoclave, ed *innestati sottocute*, videro che mentre nei primi giorni sono ancora dimostrabili " in sito ,, bacilli acido-resistenti, successivamente essi non sono più rilevabili, e si riscontrano, in vece loro, numerosissimi granuli Gram-resistenti, inclusi nei leucociti. Con osservazioni scalari si possono così seguire le progressive trasformazioni del bacillo tubercolare fino alla sua completa dissoluzione granulare. Maragliano e Sivori hanno trovato che a questa lenta dissoluzione, corrisponde un lento e continuo passaggio in circolo di materiali tubercolari a funzione di antigene, di fronte ai quali l'organismo deve reagire con la produzione di principii antagonisti. La vaccinazione di Maragliano avrebbe appunto lo scopo di creare coi

cadaveri dei bacilli, dei focolari periferici di flogosi tubercolare dal quale passano lentamente e progressivamente in circolo, degli antigeni tubercolari.

In genere, si ritiene sufficiente ai fini immunitari, la *creazione* di un *focolaio unico* ottenuta con l'introduzione, nell'organismo, una volta tanto, di materiale tubercolare morto, e ciò in base alle osservazioni di alcuni sperimentatori, i quali avrebbero notato, come colle immunizzazioni ripetute e progressive, si arrivi ad un punto in cui, anche continuando l'introduzione di materiale tubercolare, non si rileva più un aumento nel quantitativo di antigeni, dimostrabili nel siero di sangue, anzi la curva di essi scende in modo deciso (Sivori).

La naturale *conseguenza del passaggio in circolo di antigeni tubercolari,* è, come si è detto, la produzione di principii antagonisti, che sono anche reperibili in maggior o minor copia negli individui affetti da tubercolosi e sulla cui presenza si basa appunto la sierodiagnosi di questa malattia

Ricordiamo tra i principali di essi, le agglutinine, le precipitine, le opsonine, le sensibilizzatrici specifiche, le batteriolisine, le sostanze anafilattizzanti, ed i fermenti mobili.

Il valore difensivo specifico di tutti questi principii è molto discusso.

Partendo da un punto di vista generico, Roemer afferma che l'esperimento permette ancora oggigiorno di dubitare che un'infezione tubercolare spontaneamente insorta od artificialmente provocata e guarita, possa proteggere da una seconda infezione tubercolare. A loro volta Citron e Kraus negano che ad un alto contenuto di anticorpi generici, corrisponda un grado altrettanto elevato di im munitá.

Quanto ai principali prodotti di reazione immunitaria, le *agglutinine* ritenute da Koch e da molti altri come l'esponente della formata immunità verso la tubercolosi, furono dalle esperienze posteriori, dimostrate incapaci di servire a valutare l'avvenuta immunizzazione, e perció la reazione agglutinante è andata sempre più perdendo terreno nella pratica sierodiagnostica tubercolare.

Lo stesso dicasi delle *precipitine,* il cui comportamento biologico è del tutto analogo a quello delle agglutinine.

Anche la *batteriolisi*, sia "*in vitro*" che "*in vivo*" considerata da Pfeiffer e da altri, come indice prezioso di immunità, è da taluni ritenuta, impropriamente, incapace di svelare il valore difensivo di un determinato siero (Citron). Difatti esistono animali privi di resistenza di fronte ad un determinato germe, mentre il loro siero è altamente batteriolitico verso il germe stesso. Questa considerazione è forse unilaterale, ma per spirito di obbiettività, deve essere riferita.

Qnanto si è detto per le batteriolisine vale pure per le *opsonine*, e tanto per le opsonine normali quanto per le *immunopsonine* o batteriotropine, poichè accade spesso di constatare un mancato parallelismo tra il valore immunitario di un determinato siero, ed il suo indice opsonico.

Ma le cose vanno diversamente per le sostanze specifiche *dimostrabili col metodo di fissazione del complemento*, nel siero di soggetti trattati con prodotti bacillari ad azione immunizzante. Difatti, di fronte ai lavori di Frugoni, Andersen, Muller, Weil e Nakaiana, Citron, Klinkert, Foà e Koch, Besançon e De Serbonnes, tendenti a dimostrare lo scarso valore delle sensibilizzatrici, come indice del potere immunitario di un siero, starebbero le esperienze di Maragliano e della sua scuola e le osservazioni di moltissimi studiosi (Porcelli, Titone, Porrini, Arloing, Besredka, Calmette, Massol, Francioni, Menabuoni, Livierato, Epifanio, Kolle, Behring, Marmorek. Delille, Gaucher, Salin e Briacourt, Jacobson, Bergeron, De Bonis e Benga), secondo i quali, le sensibilizzatrici specifiche, sarebbero capaci di rivelare il grado di immunità insito in un determinato siero

I risultati talora contradditori, ottenuti da sperimentatori differenti, sarebbero con ogni probabilità imputabili alla grande delicatezza tecnica della reazione

In questi ultimi anni, nella Clinica di Genova, vennero introdotte nella metodica di questa reazione, alcune importanti modificazioni, di cui parlerò più avanti, intese ad eliminare parecchie cause di errore. Le ricerche condotte con la metodica modificata, avrebbero permesso di constatare. che gli animali resistono tanto più alla tubercolosi, quanto più il loro siero è ricco di anticorpi rilevabili col metodo di Bordet-Gengou; che i sieri di animali, ricchi

in anticorpi, hanno un reale valore antimicrobico e che esiste parallelismo tra il contenuto in anticorpi di un malato di tubercolosi e la sua resistenza all' infezione E poichè col metodo stesso è sempre possibile mettere in evidenza con notevole precisione gli antigeni accanto agli anticorpi specifici, se ne rarebbe dedotto che, esso, se ben adoperato, permette di stabilire una specie di bilancio tra l' offesa e la difesa, tanto negli animali d' esperimento vaccinati od infettati col bacillo di Koch, quanto negli individui affetti da malattie tubercolari.

Ammessa nelle sensibilizzatrici tubercolari la capacità di servire di indice dei poteri difensivi dell' organismo, Sivori, negli animali vaccinati con vaccino antitubercolare, avrebbe notato che gli antigeni aumentano nel siero di sangue fin verso il 60° giorno dalla avvenuta vaccinazione, e poi si mantengono nella medesima quantità da quattro a sei mesi, indi diminuiscono in modo notevole, ma non scompaiono dal siero; la produzione invece di anticorpi non è cospicua fino al 60° giorno, ma aumenta da tale epoca in poi e tocca il suo massimo tra il 4° ed il 6° mese dopo l' innesto; indi diminuisce, ma assai più lentamente di quel che avvenga per gli antigeni.

In altre parole, nei soggetti vaccinati, gli antigeni tubercolari si ritroverebbero nell' organismo in quantità sempre maggiore mano a mano che ci si allontana dal momento della inoculazione, ed a questo stimolo continuato, l' organismo risponderebbe con la produzione di sostanze difensive le quali perdurerebbero anche quando le sostanze tossiche sarebbero scemate di quantità per l' esaurimento del focolaio iniziale di produzione degli antigeni.

A conclusioni presso a poco analoghe giunse Martelli di Buenos Aires, con numerose ricerche, instituite nello stesso campo. Difatti, egli avrebbe trovato, nel periodo che segue quasi immediatamente l' introduzione di materiale tubercolare morto nell' organismo, la presenza pressochè esclusiva di antigeni, nel siero di sangue.

Gli anticorpi comparirebbero solo più tardi, però aumenterebbero poi abbastanza rapidamente in quantità, così da sorpassare gli antigeni due o tre mesi dopo l'innesto. Da querto momento si

inizierebbe la discesa nella curva degli antigeni, mentre non muterebbe l' altezza di quella degli anticorpi.

Adoperando mezzi di indagine biologica affini ai sopracitati, Duquàire, avrebbe constatato che la vaccinazione antitubercolare provocherebbe un immunizzazione attiva assai più completa della tubercolina, e molto simile a quella che la scrofolosi conferisce di fronte alla tubercolosi e Webb, Burton, Bordet e Kiepe avrebbero visto che, negli animali, piccole dosi di vaccino antitubercolare, provocherebbero la comparsa, nel sangue, di anticorpi specifici in discreta quantità, e, molte volte anche un' immunità buona e durevole contro dosi mortali di bacillo tubercolare.

Tutte le ricerche fin qui riportate sono state eseguite sul siero di sangue, ma è d'uopo ricordare che sostanze specifiche di reazione, rilevabili col metodo Bordet Gengou, sono state pur rinvenute in tutti i liquidi organici degli animali vaccinati ed in tutti i tessuti dell' organismo.

Il passaggio in circolo di antigeni tubercolari, in seguito a vaccinazione, oltre che con le diverse reazioni finora ricordate, si può anche dimostrare, sebbene in modo indiretto, con la *cuti o con l' oftalmo-reazione*

Manfredi, seguendo l' indirizzo ricevuto da Maragliano, studiando nei soggetti sani e sicuramente indenni da tubercolosi, ma inoculati con materiale tubercolare morto, l' ipersensibilità ai veleni tubercolari, vide che la prova della tubercolina dapprima era negativa e diventava positiva da 20 a 30 giorni dopo la vaccinazione e così pure le prove della cuti e dell' oftalmo-reazione, primieramente negative, apparivano positive da 5 a 23 giorni dopo l' innesto.

Secondo questi risultati, l' introduzione di materiale tubercolare, creerebbe nell' organismo uno stato di ipersensibilità ai veleni tubercolari dovuta a ciò che antigeni analoghi sarebbero già passati in circolo, cioè sarebbero già venuti a contatto coll'organismo stesso.

Convien ancor qui ricordare che l' introduzione nell' organismo di materiale tubercolare, ed il conseguente passaggio in circolo di antigeni specifici non avviene senza dar luogo, oltre che alla reazione immunitaria nel senso stretto della parola, anche a *fenomemi collaterali di reazione generale*

Due di questi fenomeni meritano essenzialmente di essere menzionati, e cioè le variazioni di temperatura e le modificazioni che si producono negli organi ematopoietici.

La *temperatura* si eleva nell'uomo, come generalmente avviene dopo l'introduzione di qualsiasi microrganismo (vaccino antitifico, anticolerico etc.), da 12 a 24 ore dopo avvenuto l'innesto, ed il rialzo termico oscilla per lo più tra 37 e 38.5, ma può andare anche oltre i 39 C. Esso dura da 3 a 4 giorni ed è talora accompagnato da risentimento infiammatorio dei gangli linfatici prossi miori. Anche negli animali (cavie, conigli, montoni, ecc.), la temperatura si innalza nelle prime 24 ore, di uno o due gradi e si mantiene elevata durante due o tre giorni. Però la febbre si deve considerare come un fenomeno quasi regolarmente concomitante, ma non assolutamente necessario per la produzione di anticorpi (Wright). Difatti anche negli animali vaccinati con bacilli della tubercolosi, accade talora di veder reazioni immunitarie verificarsi, senza oscillazioni molto accentuate nella temperatura.

Le *modificazioni* che si producono negli *organi ematopoietici* in seguito a vaccinazioni antitubercolari, furono studiate in epoche recenti da Rubino, e si potrebbero così riassumere: Dopo la vaccinazione si trova aumentata la resistenza globulare. Sono pure numericamente aumentati i leucociti polinucleari eosinofili, ed il loro aumento è persistente; aumenterebbero pure di numero i globuli rossi, e sebbene di norma ciò non duri più di 10 o 15 giorni dalla vaccinazione, in taluni animali e sopratutto nell'uomo, si noterebbero vere poliglobulie, che durerebbero più di un mese dopo l'innesto. Variabile sarebbe il contegno dei globuli bianchi: diminuirebbero in genere i linfociti nelle prime 24 ore dalla vaccinazione, poi aumenterebbero fino a rappresentare il 73 °/₀ degli elementi bianchi, e poco tempo dopo ritornerebbero alla norma o resterebbero leggermente aumentati. Anche aumentati sarebbero, in genere, i grandi linfociti. Non si vedrebbero mai granuli sudanofili, neppur quando nel punto d'innesto si forma un piccolo ascesso, il che sarebbe, secondo l'autore, assai importante perchè i leucociti sudanofili hanno sovente il significato di fagociti (Cesaris-Demel), e come tali dovrebbero essere più attivi durante i processi d'immunizzazione.

Lavorando sullo stesso argomento, Manfredi avrebbe osservato che nel decorso della vaccinazione antitubercolare nell'uomo, si ha aumento numerico di globuli rossi, lieve diminuzione di emoglobina, e modico aumento di leucociti, e sopratutto di linfociti.

Anche Brosamlen avrebbe notato che mentre l'inoculazione di materiali tubercolari negli individui sani, non influisce, sulla formula leucocitaria, nei tubercolosi dà luogo a leucocitosi ed eosinofilia, interpretabili come l'esponente d'uno stato anafilattico consecutivo ad una reazione difensiva dell'organismo.

Passate così in rassegna le *principali modificazioni indotte nell'organismo dall'introduzione in esso di materiale tubercolare morto*, ricordo per ultimo le osservazioni praticate sugli animali vaccinati per saggiarne la *resistenza* di fronte alla infezione od all'intossicazione sperimentale.

E' chiaro che pur avendo le ricerche fin qui menzionate molta importanza per far riconoscere il contenuto di un siero in principi difensivi, tuttavia la prova biologica, in vivo, è sempre i mezzo più sicuro per constatare il valore immunizzante di un determinato vaccino. Meritano a questo proposito speciale ricordo le ricerche eseguite da Connio, sugli animali e sopratutto sulle scimme, con lo scopo di studiarne la resistenza specialmente all'infezione sperimentale Maragliano a tal uopo fece eseguire una larga serie di esperienze a Connio, il quale iniziò i suoi saggi sopra un lotto di 10 scimmie assolutamente indenni da tubercolosi: cinque di esse furono vaccinate mediante l'introduzione intradermica al braccio, di materiale tubercolare morto. Durante il trattamento, una scimmia morì; le altre quattro, le quali presentavano, biologicamente, assai spiccata la reazione immunitaria, furono inoculate nel peritoneo, unitamente alle altre cinque non vaccinate, con 1/100 di mmgr. di bacilli di Koch, vivi, debitamente emulsionati in soluzione fisiologica, e provenienti dallo stesso ceppo di cultura che aveva servito per la preparazione del vaccino antitubercolare.

Delle quattro scimmie vaccinate prima dell'infezione sperimentale, tre sopravvissero, conservandosi in stato apparente di perfetta salute, e la quarta, venuta a morte, fu riscontrata all'autopsia, esente da qualsiasi lesione tubercolare.

Le scimmie non vaccinate morirono tutte, nello spazio da uno

ad otto mesi, e presentarono tutte, all'autopsia, lesioni tubercolari più o meno profonde e generalizzate.

Secondo Connio, la vaccinazione avrebbe conferito all'organismo di questi animali, un aumento notevole di resistenza specifica di fronte all'infezione provocata con dosi limitate di bacilli tubercolari, se pure non avrebbe loro procurato la totale refrattarietà all'inoculazione di dosi di bacilli tubercolari, certamente letali per animali non vaccinati.

In conclusione, la introduzione di bacilli tubercolari morti, fatta una volta tanto, sottocute, produrrebbe la comparsa in circolo di sostanze difensive specifiche (dimostrabili con mezzi di indagine biologica), le quali conferirebbero all'organismo una maggior resistenza, di fronte all'azione patogena del bacillo stesso.

Vaccinazione antitubercolare durante la gravidanza.

Gli studiosi i quali si sono occupati della possibilità di trasmettere sostanze ad azione immunizzante antitubercolare, dai genitori al prodotto del concepimento, hanno preso in considerazione due principali modalità di trasmissione: una *extraplacentare* ed una *transplacentare*.

La prima consiste nella trasmissione *germinale* di un'immunità naturale propria di una data specie, o di un determinato gruppo di individui; oppure di un'immunità assunta dalla madre o dal padre, o da entrambi i genitori, vuoi accidentalmente, vuoi in seguito ad immunizzazione artificiale. Tanto l'uovo che lo spermatozoo, quanto entrambi gli elementi sessuali, potrebbero essere i portatori dei principii immunizzanti.

Maffucci cercando di provocare nel pollo l'eredo-predisposizione tubercolare con l'introdurre nelle uova, culture virulente di bacilli di Koch, avrebbe constatato invece, che i pulcini nati dalle uova così trattate, presentano, piuttosto che un eredo-predisposizione, un'eredo-immunità. Difatti essi sopravvivono, oppure muoiono solo tardivamente con forme di tubercolosi fibrose abacillari, mentre i polli adulti di controllo, che sono stati pure inoculati, raramente sopravvivono più di un mese alla tubercolizzazione. Secondo Maf-

fucci questa immunità dei pulcini, non sarebbe dovuta all'attenuazione delle culture, in seguito alla loro introduzione nell'uovo, ma alla distruzione dei bacilli fatta dall'embrione. Le tossine tubercolari messe così in libertà provocherebbero la formazione di sostanze vaccinanti. Se la distruzione è totale, il pulcino si salva completamente, altrimenti nasce portando in se dei bacilli, i quali lo uccideranno più tardi, entro qualche mese.

Anche Maragliano ha posto in evidenza, nelle uova di galline alimentate con bacilli tubercolari morti o con estratti acquosi bacillari, la comparsa di sostanze antitubercolari, e Calmette ha dimostrato sperimentalmente la possibilità della trasmissione ereditaria nei riguardi della tubercolosi

A sua volta Sanarelli sostiene che la specie umana va progressivamente aumentando la propria resistenza di fronte alla tubercolosi, in virtù di una progressiva immunizzazione ereditaria, trasmessa di discendenza in discendenza, e rafforzata negli ambienti collettivi, pulverulenti e bacillizzati, da una vaccinazione inconsapevole prodotta dalla graduale ripetuta e ben tollerata penetrazione nell'organismo di bacilli di Koch. Naturalmente, la formazione degli anticorpi specifici, rappresenterebbe nella tubercolosi, una funzione assai più debole e fugace, che in altre malattie acute, quali la difterite, il tetano, il carbonchio, la rabbia etc.; ma anche nella tubercolosi, attraverso alle successive generazioni, non verrebbe trasmessa, come si è creduto fino ad oggi, una predisposizione ad ammalare ed a soccombere per tubercolosi, ma piuttosto una maggior resistenza di fronte all'azione patogena del bacillo di Koch

Però se la questione *dell'eredo-immunità* tubercolare riveste un alto interesse scientifico e sociale, non certo minore è quello che spetta all'altro problema dell'*immunità acquisita dal feto* mediante sostanze salvanti che *attraverso la placenta* gli provengono *dalla madre.*

La questione si collega intimamente a quella degli scambi materno fetali, attraverso la placenta, di germi e di tossine, o, comunque di sostanze a funzione immunizzante; ma io andrei troppo oltre il compito che mi sono prefisso, se volessi ricordare i lavori pubblicati in questi ultimi anni su questo importantissimo capitolo della fisiopatologia ostetrica. Per la conoscenza di esso, mi richiamo

al recente trattato di Ferroni e mi limito a riferire brevemente su quanto può avere più stretta attinenza col presente lavoro.

Rammento anzitutto che gli studiosi sono in massima concordi nell'ammettere nel feto dei soggetti non vaccinati, una deficienza degli elementi necessari a produrre una reazione immunitaria generica contro le infezioni batteriche. Scarseggiano cioè nel feto, complementi, ambocettori, iso ed eterolisine ed agglutinine, opsonine, fermenti mobili ed antitriptici, e sensibilizzatrici anafilattiche (Resinelli, Bolaffio, Soli, Bertino, Zedda, Moro, Basso, Fedla, Raineri, Turton e Appleton, Wright, De Blasi, etc).

Nei riguardi del bacillo di Koch, Duverger trovò reazione tubercolinica sempre negativa nel siero di feti nati da madri sane, come negativa risultò a Manfredi, Gardini, Covazza, la siero-reazione tubercolare, sempre nei nati di soggetti non vaccinati.

Bolaffio, Turton e Appleton, dimostrano che negli animali non vaccinati, il potere opsonico del siero di sangue del feto, negli ultimi tre mesi di vita intrauterina e del neonato, è, per il bacillo tubercolare, di poco inferiore a quello materno, e talora uguale a circa 2/3 di quello materno.

Però, come si tende ad ammettere nel feto di madre non vaccinata, un difetto congenito di principii immunitari, antitubercolare si tende pure ad ammettere che passino, attraverso la placenta, nel feto, quasi tutti i principii a funzione immunizzante, che si possono artificialmente introdurre nell'organismo materno o chei vengono a trovarvisi in seguito ad infezioni batteriche, e cioè, complementi, sensibilizzatrici specifiche, precipitine, batterio ed immunagglutinine, batterio ed immunemolisine, antitossine, immuno psonine, sensibilisine anafilattiche (Maffucci, Lo Monaco e Panichi, Segale, Tizzoni e Cantani, Ferroni, Arloing, Raineri, Andersen, Pagano, Lagriffoult e Pagès. Flamini, Basso, Pirani, etc,).

In esperienze condotte sul passaggio diaplacentare di microorganismi e di sostanze a funzione immunizzante dalla madre al feto, De Blasi ha dimostrato che sebbene da caso a caso esistano differenze, in rapporto con la natura degli anticorpi, con la specie degli animali, con l'epoca di gravidanza nella quale si inizia il trattamento e con il momento in cui avviene l'aborto od il parto, possono sempre passare dalla madre al feto, quantità variabili di

anticorpi immunizzanti od anafilattizzanti, sia in seguito ad un processo di immunizzazione attiva, che in seguito ad un processo di immunizzazione passiva dell' organismo materno.

Anche Ferroni fa dipendere gli scambi transplacentari materno, fetali di sostanze a funzione immunizzante, da un certo numero di fattori dei quali i principali sarebbero: la specie dell' animale su cui si esperimenta, la quantità di sostanza immunizzante presente nella madre, il tempo che intercede tra il momento in cui la madre fu immunizzata e quello in cui si esamina il feto, l'azione protettiva, (intercettiva) e regolatrice (permittente, selettiva, modificatrice) della placenta (a sua volta subordinata all'integrità anatomo-funzionale od alla maturità della placenta stessa), e lo stato del feto nel momento in cui è reso possibile il passaggio in esso delle sostanze salvanti materne cioè la capacità delle sue cellule di reagire agli stimoli immunitari, la sua vitalità e la sua età.

Anche per ciò che concerne la *tubercolosi* gli AA sono in massima concordi nell'ammettere il passaggio di sostanze specifiche dalla madre al feto attraverso la placenta.

Bossi dimostrò sperimentalmente che i feti di donne tubercolotiche possono essere attaccati nella vita endouterina, se non dai *bacilli*, dai *veleni tubercolari*, e che questo passaggio di tossine dalla madre al feto può contribuire a determinare in quest'ultimo, uno stato di ritardato sviluppo e di debolezza organica, che lo rendono predisposto all' attecchimento del germe nei primi mesi della vita extrauterina.

Cerruti riscontrò nei nati da cavie inoculate con veleni tubercolari uno stato marantico molto accentuato con mancanza assoluta del cellulare sottocutaneo, ed ipertrofia spiccatissima di tutti gl- organi cavitari e pervenne anch' egli alla conclusione che il passaggio di bacilli tubercolari da madre a feto è raro, mentre è frei quente quello di tossine, le quali creano uno stato di eredopredisposizione nell' organismo fetale.

Schenk dimostrò, trattando le cavie con emulsioni tubercolari e con bacilli, che le sostanze complementari del siero di sangue, presentano un evidente parallelismo quali e quantitativo, tanto nelle madri, quanto nei feti.

Bolaffio, Busse e Flamini videro che abbassando artificialmente

nelle cavie a termine di gravidanza il potere opsonico del sangue materno, si abbassa adeguatamente il poter opsnonico del sangue fetale.

Agglutinine e precipitine, ma non ambocettori, furono trovati nella Clinica Medica di Genova da Fedeli nei feti di cavie, trattati con materiale tubercolare; agglutinine soltanto, furono rinvenute da Arloing nel corso di indagini similari. Morelli pure nella Clinica Medica di Genova, tubercolizzando le cavie nel periodo di gestazione, dimostrò, la presenza di anticorpi specifici, tanto nel siero della madre che in quello dei feti.

Calmette, Costa, Gardini, Covazza, trovarono quasi sempre cuti, oftalmo e siero-reazione tubercolare nei feti nati da madri tubercolotiche.

De Blasi, praticando iniezioni sottocutanee od endovenose di tubercolina a conigli ai quali 24 o 48 ore prima era stato intro dotto nel peritoneo, siero di sangue di donne tubercolotiche o siero di sangue di feti, nati da donne tubercolose, provocò nei conigli fenomeni anafilattici ben manifesti e dimostrò così, che sostanze ipersensibilizzanti per la tubercolosi, possono passare dalla madre nel feto.

Anche Hânot e Marfan avrebbero notato, nei casi di tubercolosi in gravidanza, la filtrazione nel feto, attraverso la placenta, di tossine tubercolari materne, capaci di agire sul feto stesso, come sostanze vaccinanti, proteggendolo, sia contro il contagio intrauterino, sia contro quello che potrebbe incontrare dopo la nascita.

Vaillard infine, constatò in feti diversi partoriti contemporaneamente dalla stessa madre, la quale era stata preventivamente immunizzata in modo attivo o passivo, reazioni immunitarie evidenti ma differenti tra loro e rispetto a quelle della madre, sia per quantità che per qualità.

Difficile assai è lo stabilire, di che genere sia l'immunità che si produce nel feto in seguito al passaggio in esso, dalla madre, di sostanze a funzione vaccinante e ciò tanto per le sostanze legate al bacillo di Koch, quanto per quelle che sono in rapporto cogli altri agenti patogeni conosciuti.

Difatti accanto a forme di immunità fetali, di natura certamente passiva, cioè giunte al feto tal quali dalla madre, se ne os-

servano altre che appaiono dovute ad una partecipazione attiva del feto ai processi difensivi che in esso si riscontrano, ed altre ancora se ne rinvengono, nelle quali sarebbe anche plausibile l'ipotesi d'un origine mista (Soli) dovuta cioè in misura diversa, alle sostanze prodotte dal feto stesso, ed a quelle che, già elaborate, gli sono pervenute dalla madre, attraverso la placenta.

Anche De-Blasi ritiene che gli anticorpi che si trovano in un nato di madre immunizzata, possano derivare tal quali dalla madre od essere il prodotto di una reazione immunitaria che ha luogo direttamente nel feto in seguito al passaggio in esso di antigeni materni, od essere anche (questa però come pura ipotesi) il prodotto di una elaborazione diretta, operata dal tessuto placentare, il quale riceve nel proprio seno gli antigeni dalla madre e fabbrica gli anticorpi per l'organismo fetale.

E, sempre in tema di scambi transplacentari, si presenta ancora un'altra questione di scarso valore pratico, ma di interesse dottrinario notevole, quella del passaggio di sostanze salvanti dal feto alla madre, anzichè dalla madre al feto.

Parecchie sono le osservazioni instituite a questo proposito da differenti autori, ma esse concernono quasi esclusivamente la trasmissione feto-materna di sostanze tossiche o coloranti, e solo poche di esse riguardano la trasmissione di prodotti a funzione immunizzante.

Nella sua monografia sull'origine del liquido amniotico, Rizzatti, ricorda i seguenti fatti: Savory e Gusserow iniettarono a feti di cagne, di gatte, di coniglie, acetato di stricnina e videro che le madri morivano pochi minuti dopo l'iniezione, mentre i feti risentivano in misura assai minore, gli effetti del veleno. Preyer e Turngreen ottennero su per giù gli stessi risultati iniettando acido cianidrico, nicotina e curarina a feti di cavia. Turngreen introducendo ioduro di potassio sotto la pelle del dorso di feti di coniglio, mentre questi stavano dentro l'utero materno, lo ritrovò poco dopo nella orina della madre; e lo stesso fatto constatarono, con la stessa tecnica Wiener coll'impiego di solfo-indigotato sodico e di glicocolla, Bar col ferrocianuro potassico, Guinard e Hochwelcher con rosalina.

Anche Kreidl e Mandl, col trattamento diretto del feto, ottennero il passaggio di immunemolisina nella madre, anzi videro che il

feto aveva la facoltà di produrre emolisine nella stessa misura della madre, avvicinandosi così ai risultati ottenuti da Raineri, nelle sue esperienze sui passaggi feto-materni di sostanze solubili a feto vivo ed a feto morto, ed a quelli ottenuti da Charrin, nello stesso senso, con l'impiego della tossina difterica e del bacillo piocianico.

Assai recentemente Grillo ritornò su questo argomento, ricercando nella cavie, la permeabilità della placenta al passaggio dal feto alla madre di sostanze coloranti (bleu di metilene), di pirrolo, di florizina, di diversi schizomiceti (b. del carbonchio, b. sottile, b. tubercolare), di protozoi (tripanosoma equiperdum) e di veleni. Egli osservò che tutte queste sostanze, in genere, passano dal feto alla madre, attraverso la placenta, senza che questa opponga serio ostacolo al loro transito, e senza che essa riporti per questo passaggio, lesioni notevoli, tranne che nel caso di trasmissione di bacilli pategeni. Difatti, inoculando direttamente culture pure e virulente di bacilli di Koch, nel corpo di feti di cavie, egli vide che le madri sopravvivevano all'inoculazione da 20 a 30 giorni e partorivano feti di arrestato sviluppo, i quali subito morivano. Le madri presentavano tutti i sintomi di una gravissima tubercolosi, con localizzazioni nei polmoni, nelle pleure e nel pericardio, cioè una tubercolosi a forma setticemica.

Mancano nella letteratura, per quel che mi consta, ricerche sistematiche sul passaggio feto-materno di sostanze a funzione immunizzante.

Venendo ora alle *osservazioni* instituite sulla *vaccinazione antitubercolare in senso stretto*, praticate *durante la gravidanza*, ricordo essenzialmente le seguenti:

De Blasi, ricercò nel 1914 la presenza di anticorpi tubercolari, nel siero di sangue di 22 feti nati da donne vaccinate una volta tanto, con vaccino antitubercolare Maragliano, 45, o 50, o 60 giorni prima del parto. I saggi biologici istituiti coi mezzi più moderni di indagine, dimostrarono la presenza di antigeni e di anticorpi tubercolari tanto nel sangue fetale che in quello spremuto dalla placenta, oltre che in quello della madre Anche nel latte delle stesse donne, furono rintracciati anticorpi tubercolari. Questi anticorpi si trovano nel sangue fetale e nel latte in deboli quantità, due mesi dopo la vaccinazione e persistono ancora 12 medesima.

In altre sue ricerche in corso di pubblicazione, lo stesso De-Blasi ha trovato che i piccoli caviotti provenienti da madre vaccinate, sopportano bene le iniezioni intraperitoneali di quantitativi di bacilli tubercolari, costantemente mortali per gli animali dello stesso peso e della stessa età, provenienti da madri non vaccinate.

L' A. riterrebbe con ciò dimostrata la possibilità di immunizzare il feto contro la tubercolosi, già dentro l' utero materno e di rafforzare questa immunità nel neonato mediante l' allattamento.

Anche Figari nella Clinica Medica di Genova, notò la presenza di materiali difensivi, contro la tubercolosi, nel latte di vacche immunizzate, e vide che gli animali nutriti con tale latte, divenivano refrattari alla tubercolosi sperimentale. Continuando più tardi le esperienze con Ricci, Figari constatò che, gli animali nati da madri, non immunizzate, e allattati con latte di animali immunizzati, presentano nei loro siero, principi specifici antitubercolari, assorbiti dalla via digerente. Anche nel siero di un bambino nutrito con latte di animale immunizzato, rinvenne in buona quantità principi difensivi antitubercolari. Analogamente Behring riconobbe l' esistenza di principii immuni generici, negli umori di animali, inoculati con materiale tubercolare.

Jemma e poco di poi Lanza nella Clinica di Maragliano, dimostrarono la possibilità di aumentare il potere agglutinante, verso il bacillo tubercolare, del siero di sangue dei bambini, allattandoli con latte di vacche immunizzate contro la tubercolosi.

Anche Bertarelli, studiando l' immunizzazione attiva e passiva dei neonati e dei lattanti, per la via digerente notò che nei giovani conigli e nelle cavie, l'immunizzazione attiva (col bacillo del tifo), avviene lenta nei primi giorni di vita, e più tardi si produce nelle stesse condizioni che nell' adulto. Così l'immunizzazione passiva con sieri (antitifici) ricchi in agglutinine e con latte agglutinante.

Infine, ed affatto recentemente, Sivori, per incarico di Maragliano, ritornò su questo argomento coll' intenzione di vedere se nel latte di vacche immunizzate con tossine ed endotossine tubercolari, si trovassero accanto a sostanze agglutinanti ed antitossiche, quei principii (antigeni ed anticorpi) che sono rilevabili col metodo di Bordet e Gengou e che secondo le moderne vedute, sarebbero,

meglio degli altri, capaci di illuminarci sull'efficienza difensiva dell'organismo di fronte al bacillo di Koch.

In due vacche sottoposte per un periodo complessivo medio di 100 giorni, alla inoculazione di tossine e di endotossine tubercolari, egli mise in evidenza tanto nel siero di sangue, quanto nel latte, antigeni ed anticorpi specifici, però nel primo in quantità maggiore che nel secondo.

Difatti mentre per il siero sanguigno potè far uso nel corso delle esperienze di diluizioni 1/100 ed anche più, per il latte la diluizione limite fu 1/1000. Un' importanza notevole viene dall' A., attribuita al fatto che nel latte, accanto agli anticorpi, si rinvengono anche discrete quantità di antigeni, in quanto a questi spetterebbe il compito di provocare negli organismi coi quali il latte viene in contatto, un'immunizzazione attiva concomitante a quella passiva fornita dagli anticorpi.

Ispirandosi allo stesso concetto, Martelli di Buenos Ayres, nell'Istituto Maragliano, ricercò gli stessi principii nel sangue e nel latte di coniglie e di pecore gravide sottoposte alla vaccinazione antitubercolare, in periodi diversi della loro gravidanza e nel siero di sangue dei loro nati, sopratutto collo scopo di vedere se la vaccinazione materna avesse un valore profilattico antitubercolare anche nei riguardi del prodotto del concepimento.

Egli osservò i seguenti fatti:

Mentre gli animali gravidi sottoposti alla vaccinazione verso la metà della loro gravidanza, reagiscono dal lato immunitario identicamente agli animali non gravidi, gli animali gravidi vaccinati all'inizio od alla fine della loro gestazione, palesano nel processo immunitario, uno svolgimento più lento e più stentato. Per spiegare questo fatto si potrebbe supporre che all' inizio della gravidanza lo stato autotossico gravidico, rallenti la reattività organica più intensamente di quello che faccia a gravidanza più avanzata, quando allo stesso stato autotossico, l'organismo della gestante si è assuefatto. La diminuzione di reattività organica nel periodo del parto, sarebbe a sua volta dovuta ai fenomeni complessi che si svolgono nell' organismo alla fine della gravidanza.

Quanto più vicino al parto è stata eseguita la vaccinazione, tanto più presto compaiono i principii difensivi nel latte dell' ani-

male vaccinato, dove l' incrocio della linea degli anticorpi su quella degli antigeni si verifica in genere più presto che sul siero di sangue dello stesso animale. Se però la vaccinazione è stata pratica nell' imminenza del travaglio, l' incrocio della linea degli antigeni su quella degli anticorpi, avviene contemporaneamente nel siero di sangue e nel siero di latte.

Le linee degli antigeni e degli anticorpi del siero di latte, sono sempre nei tracciati grafici, più basse di quelle corrispondenti, del siero di sangue.

I nati di madri vaccinate, presentano nel loro siero sanguigno, antigeni ed anticorpi specifici, come i nati da madri non vaccinate, ma allattati con latte di animali vaccinati.

Nel siero sanguigno di nati da madri vaccinate, allattati con latte di femmina vaccinata, si trova maggior quantità di antigeni ed anticorpi specifici che nel siero di latte delle madri vaccinate, per il sommarsi nel feto dei due fattori: eredo immunità e assorbimento dalla via gastrica di sostanze ad azione immunizzante. Negli animali allattati con latte di vacca immunizzata, la comparsa della reazione organica è più precoce, ma di minor durata nella sua fase utile, che in quelli allattati con latte di femmina vaccinata.

Le prove della ipersensibilità di fronte ai comuni antigeni tubercolari cioè la cuti e l' oftalmo-reazione, sono positive anche negli animali di media taglia, da 40 a 60 giorni dopo l' innesto, come sono positive nei loro nati.

Ammettendo che gli anticorpi abbiano il valore di principii difensivi specifici, la loro presenza nel sangue di nati da madri vaccinate, proverebbe che la vaccinazione antitubercolare svolge un' azione profilattica non solo verso l' individuo, ma anche verso la discendenza.

ESPERIENZE PERSONALI

Le ricerche che mi accingo ad esporre sono state da me instituite avendo di mira, non tanto la ripetizione di quanto era già stato fatto, su vasta scala, da De Blasi e da Martelli, ma piuttosto lo studio un po' particolareggiato del valore che nella produzione

del fenomeno complesso dell' immunità materno-fetale, assumono separatamente e solidalmente i due fattori: vaccinazione antitubercolare e stato autotossico gravidico.

Accanto a queste, altre ricerche furono da me praticate, per studiare con qualche dettaglio, il passaggio di sostanze salvanti, dal feto alla madre, oltre che dalla madre al feto.

Rivolgo qui i miei più sentiti ringraziamenti al Prof. Bertarelli, che mi accordò cortese ospitalità nel suo Istituto e mi fu largo di consigli e di ammaestramenti, al Prof. De Blasi che mi fornì numerose indicazioni tecniche ed al Prof. Sivori, il quale mise a mia disposizione, col gentile consesso del Prof. Maragliano, una parte del materiale biologico che mi era necessario per le osservazioni.

Prima di trascrivère i protocolli, descriverò la tecnica da me seguita nei diversi saggi.

Come *materiale vaccinante* feci uso costante di Vaccino Maragliano, il quale a differenza di altri vaccini antitubercolari, preparati da grandi Istituti Scientifici, e cito tra questi, il vaccino Belfanti ed il vaccino Sclavo, è allestito esclusivamente per la profilassi, anzichè per la terapia dell' infezione tubercolare.

Il vaccino Maragliano è preparato con bacilli tratti da colture virulentissime di tubercolosi umana, uccisi, sgrassati, seccati, finamente polverati in un mortaio e quindi impastati con glicerina. Il prodotto si presenta come una pasta giallo grigia, in tutto simile esteriormente al vaccino Jenneriano del quale è un po' più denso. Si conserva in piccoli tubi di vetro, con le medesime precauzioni che si usano per gli altri vaccini.

Rammentiamo, di passaggio, che nell' uomo, Maragliano consiglia di *praticare la vaccinazione*, nella regione deltoidea, *mediante innesto* del materiale per infissione fino al derma e che altri invece, si limitano ad applicare la polpa vaccinale, sopra scarificazioni praticate in 3 serie, nella cute del braccio.

Negli animali, l' inoculazione si fa mediante una iniezione praticata con una comune siringa, nel tessuto sottocutaneo del dorso, previa depilazione, eseguita quest' ultima, coi comuni depilatori (depilatorio di Unna) o mediante strappamento diretto dei peli (cavie, conigli).

Nelle cavie, la *quantità* di *vaccino* da me adoperata, corrispondeva ad 1/10 di tubetto e nei conigli talora ad 1/8 e talora ad 1/4 di tubetto.

Gli animali, preventivamente tenuti in osservazione, per escludere che fossero affetti da qualsiasi malattia, furono tutti indistintamente, inoculati una volta sola, con materiale vaccinante, e mai, in nessun caso sottoposti a ripetute vaccinazioni.

I *saggi* sui diversi *umori organici* degli animali vaccinati, si facevano, in media di 30 in 30 giorni dopo l'inoculazione.

Il *sangue* da esaminare, si prelevava, in quantità di 7-8 cm^3 per volta, dalla carotide degli animali adulti o degli animali giovani che avevano già però raggiunto un certo grado di sviluppo. Nei neonati, si ricavava o mediante puntura del cuore, o mediante decapitazione, l' una o l' altra eseguite dopo parecchie ore di digiuno dell' animale per avere sieri limpidi, e non troppo ricchi dei principii proprii del latte.

Dal sangue, il *siero* si otteneva per separazione spontanea del coagulo (in media dopo 24 ore), talora anche mediante centrifugazione. In ogni modo, lo si inattivava sempre, appena possibile, a 56 58 c. per mezz' ora e quando non poteva essere subito esaminato gli si aggiungeva a freddo un po' di etere, si agitava, si lasciava un po' di tempo in ghiacciaia, indi si introduceva in fiale di vetro sterile, che si chiudevano alla fiamma. Una volta infialato, lo si conservava in luogo fresco, con le cautele che si impiegano abitualmente per i sieri ed i vaccini.

Gli *estratti* di *organi*, si preparavano c n quantità ben deter minate di organi e tessuti materni o fetali, raccolti in modo sterile dagli animali che erano stati sacrificati Questi organi si lavavano accuratamente con soluzione fisiologica, poi si tagliavano in piccoli pezzi e si trituravano mescolati a polvere di quarzo dentro mortai d' agata con aggiunta di parti uguali di soluzione fisiologica Tutte queste operazioni venivano condotte con strumenti sterilizzati, e osservando rigorosamente l' asepsi. La miscela così ottenuta, si poneva in termostato per dodici ore, dopo aver aggiunto un po' di toluolo, indi si filtrava.

Gli estratti che ne risultavano erano di colore variabile a seconda dei varii organi dai quali provenivano, per lo più giallo

chiaro o arancione, tutti limpidi ed inodori e si conservavano con qualche aggiunta supplementare di toluolo, in fiale di vetro sterilizzate e chiuse alla fiamma.

Il *siero* di *latte* si preparava raccogliendo il latte in un recipiente aperto, e ponendo questo in termostato per 10 o 12 ore, così da permettere la separazione completa della caseina dal siero, metodo questo, che anche Martelli ritiene preferibile a quello dell' aggiunta di piccola quantità di pegnina, o di acido acetico o di acido cloridrico. Il siero si filtrava su carta, talora dopo supplementare centrifugazione.

Agglutinazione — Si preparavano 5 provette, nella prima si introducevano 20 goccie di cultura omogenea di bacilli tubercolari, nella seconda 15 goccie, nella terza 10 goccie, nella quarta 5 goccie, nella quinta 20 goccie. Si aggiungeva in ciascuna delle prime quattro, una goccia del siero da saggiare, si agitava, si lasciava 24 ore in termostato. indi si esaminava.

Si interpretava come positiva la comparsa in fondo al liquido, di piccoli fiocchi, simili a quelli che si osservano nella reazione di Vidal. La quinta provetta di controllo, doveva mantenersi limpida.

Precipitazione. — In un tubo di saggio, si mettevano 20 goccie del siero in esame, poi si aggiungevano delicatamente altre 20 goccie di polpa bacillare, si lasciava la miscela da 1 a 2 ore in termostato, indi si esaminava.

Si giudicava positiva la reazione, se compariva nel tubo un anello biancastro.

Indice opsonico. — I globuli bianchi venivano ricavati dal cavo pleurico di cavie o di conigli, nel quale erano state introdotte sostanze attivanti la leucocitosi (aleuronato). I bacilli erano tratti da culture su agar colorato con verde di malachite e bleu di metile (il bacillo tubercolare assume elettivamente il verde e lascia il bleu), seconda la metodica adottata da Sivori nell'Istituto Maragliano per le osservazioni ripetutamente fatte. La miscela si faceva mediante una lunga e sottile pipetta nelle prime 12 ore dopo la raccolta del sangue, e l' opsonizzazione si faceva avvenire in termostato durante 15 o 20 minuti I bacilli, già colarati nella cultura, cedevano una piccolissima parte del loro calore, ai leucociti che li inglobavano, e spiccavano per la loro tinta intensa, sulla

tinta più tenue e più diffusa di questi. In alcuni casi in cui si erano adoperati bacilli provenienti da culture non colorate, i preparati si leggevano dopo averli colorati col liquido di Ziehl. Il computo si faceva secondo il metodo di Wright, contando mai meno di 50 globuli bianchi e possibilmente 100. Servivano di controllo, animali dalla stessa specie, non vaccinati.

Fissazione del complemento. — Il metodo impiegato fu quello di Bordet-Gengou, modificato da Gardi e Sivori.

Il siero in esame si diluiva in soluzione fisiologica, e di questa soluzione si prendeva sempre 1 cmc.

L' emolisina adoperata era quella dell' Istituto Sieroterapico Milanese, preparato verso globuli rossi di bue.

I globuli rossi di bue si sospendevano in soluzione fisiologica all' 88 %₀, nelle proporzioni di 1,50 : 100, o di 2 : 100, cioè in proporzioni più elevate che quelle usate da London, e questo per rendere più visibili le sfumature di colore, al momento della lettura dei risultati.

L' alessina si preparava raccogliendo, mediante decapitazione tutto il sangue di una cavia sana, in provette da centrifuga, e centrifugaado per 20 minuti; indi si diluiva il siero in soluzione fisiologica, nella proporzione di 1 : 20 e si adoperava freschissimo.

Come antigene testo si usava in tutte le prove e un prodotto endotossico di bacillo tubercolare, puro, esente cioè da anticorpi specifici. Questo antigene si diluiva in soluzione fisiologica, nella proporzione di 1 : 8.

Come anticorpo testo, mi servivo di un siero immune verso i principii endotossici bacillari, anch'esso puro, e sicuramente esente da antigeni tubercolari; secondo le norme praticate all' Istituto Maragliano, questo anticorpo testo si diluiva nella soluzione fisiologica in proporzione di 1 : 10.

La purezza degli antigeni e degli anticorpi, ha molta importanza perchè gli antigeni e gli anticorpi contenuti nello stesso siero, hanno tra di loro maggiore affinità di quella degli antigeni e degli anticorpi contenuti in sieri diversi, e perciò quando si fanno delle esperienze per ricercare, in un dato siero, gli antigeni e gli anticorpi, in presenza di alessina, gli antigeni contenuti nell' anticorpo testo, o gli anticorpi contenuti nell' antigeno testo, producono

una sottrazione di alessina che può indurre in errori di interpretazione.

Prima di eseguire le prove definitive coi diversi sieri ed estratti, procedevo al dosaggio dei poteri emolitici ed antiemolitici di tutte le sostanze che entravano in giuoco nella reazione, perchè è noto che tutti i sieri come le emulsioni organiche e le polpe bacillari, sono dotati di poteri emolitici, ma sopratutto antiemolitici, i quali nella reazione di Bordet-Gengou, possono essere causa di errore.

I poteri emolitici sono facili da correggere, mediante la determinazione dell'unità emolitica ad essi relativa, cioè della quantità minima di emolisina necessaria e sufficiente a sciogliere totalmente 1 cmc. di globuli rossi in sospensione 2 : 100, in presenza di un eccesso di emolisina.

Più delicata e complessa è la correzione dei poteri antiemolitici delle varie sostanze che concorrono alla reazione. La correzione si potrebbe fare, o con l'emolisina, o con l'alessina, o con entrambe queste sostanze; però in pratica la correzione dei poteri antiemolitici correggibili coll'emolisina, si può trascurare, perchè le prove si eseguiscono con un multiplo elevato dell'unità emolitica, multiplo che non può avere alcuna influenza sul reparto finale.

Invece il potere antiemolitico correggibile coll'alessina, deve essere valutato e corretto ricercando nelle diverse sostanze che prendono parte alla reazione, l'unità alessinica, cioè la quantità minima di alessina necessaria per dare con ciascuna di esse sostanze, l'emolisi totale di 1 cmc. di globuli rossi in sospensione di 2 %, in presenza di un eccesso d'emolisina.

Le diverse unità alessiniche delle differenti sostanze che entrano in campo nella reazione, si devono porre a confronto colla unità alessinica della soluzione fisiologica adoperata per le esperienze, unità alessinica che si assume come unità di misura.

Per eseguire le diverse prove, si diluivano, come già si disse, le diverse sostanze concorrenti alla reazione, in soluzione fisiologica (0,88 %), nelle seguenti proporzioni: siero in esame: 1:10; alessina: 1:20; antigene-testo: 1:8; anticorpo testo: 1:10.

I globuli rossi di bue si sospendevano in soluzione fisiologica (0,88 %), nelle proporzioni di 2:100.

Il siero emolitico, verso bue, si diluiva in soluzione fisiologica

nelle proporzioni di 1:10. Da questa prima soluzione se ne faceva un'altra 1:10, da questa una terza 3:7, cioè 1:333 Di quest'ultima si prendeva ogni volta 1 cmc. cioè un multiplo elevato dell' unità emolitica (approssimativamente: U E. × 50).

Prove preliminari. — Per ogni siero od estratto organico da esaminare occorrevano 40 tubi di saggio.

Scopo di questa prova preliminare era la ricerca dell'unità alessinica, in grembo alla soluzione fisiologica, cioè dell'unità alessinica fondamentale (U. A') e delle unità alessiniche secondarie in grembo al siero in esame, all' antigene testo ed all' anticorpo testo (U. A' del siero, U. A' dell' antigene, U. A' dell' anticorpo) e dell' unità alessinica definitiva (U. A") risultante dalla somma delle unità alessiniche secondarie, dalle quali veniva sottratta l'unità alessinica fondamentale.

In tutti e 40 i tubi si metteva 1 cmc di sospensione di globuli rossi 2 %, poi:

Nella prima serie di dieci tubi si poneva 1 cmc. di soluzione fisiologica.

Nella seconda serie di dieci tubi si poneva 1 cmc. di anticorpo 1:10.

Nella terza serie di dieci tubi si poneva 1 cmc. di antigene 1:8-

Nella quarta serie di dieci tubi si poneva 1 cmc. di siero in in esame 1:10.

In tutti e 40 i tubi si aggiungeva 1 cmc. di emolisina verso bue 1:333. Indi in ogni serie di 10 tubi si aggiungeva alessina 1:20, in quantità progressivamente crescenti, e cioè nel 1° tubo cmc 0,10; nel 2°, cmc. 0,20; nel 3°, cmc. 0,30 e così via fino al 10° dove si introduceva 1 cmc. di alessina 1:20.

Si aggiungeva in ogni tubo tanta soluzione fisiologica quanta era necessaria per portare il volume complessivo a 5 cmc.

Previa moderata agitazione, si mettevano tutti e quanti i tubi in termostato e dopo 2 ore si faceva la lettura.

Le prove riuscivano bene quando la gamma di colore risultante dalla fissazione del complemento, era progressiva.

Il titolo alessinico si desumeva dal 1° tubo di ogni serie di dieci, dove compariva emolisi totale.

Prove definitive. — Per ogni esame di siero e di estratto or-

ganico, occorrevano sei tubi, di cui i primi quattro per controlli. Il contenuto dei singoli tubi era il seguente:

1° tubo: 1 cmc. di soluzione fisiologica + alessina 1:20 nella quantità corrispondente al valore dell'unità alessinica (unità fondamentale), rintracciata nel 1° gruppo di 10 tubi, delle prove precedenti (1° tubo, dei dieci, dove c' era emolisi totale).

2.° tubo. 1 cmc. di anticorpo testo 1:10 + alessina 1:20, nella quantità corrispondente al valore dell' unità alessinica (unità secondaria dall'anticorpo), rintracciata nel 2° gruppo di tubi delle prove precedenti.

3.° tubo: 1 cmc. di antigene 1:8 + alessina 1:20, nella quantità corrispondente al valore de l' unità alessinica (unità secondaria dell' antigene), rintracciata nel 3° gruppo di 10 tubi delle prove precedenti.

4.° tubo: 1 cmc. di siero in esame 1:10 + alessina 1:20, nella quantità corrispondente al valore dell' unità alessinica (unità secondaria del siero in esame), rinvenuta nella 4.ª serie di 10 tubi delle prove precedenti

5.° tubo: 1 cmc. di anticorpo testo 1:10 + 1 cmc. di siero esame 1:10 + alessina nella quantità risultante dalla somma delle unità alessiniche dell'anticorpo e del siero, dalla quale si è sottratta l' unità alessinica della soluzione fisiologica. Si aggiungeva nel tubo soluzione fisiologica finchè il volume totale del liquido contenuto nel tubo fosse di 3 cmc

6.° tubo: 1 cmc. di antigene testo 1:8 + 1 cmc. di siero in esame 1:10 + alessina nella quantità risultante dalla somma delle due unità alessiniche dell'antigene e del siero da cui si sottraeva la unità alessinica della soluzione fisiologica. Si aggiungeva nel tubo soluzione fisiologica fino al volume complessivo di 3 cmc

Si mettevano i 6 tubi in termostato per 2 ore, poi si aggiungeva in tutti e sei, 1 cmc. di emolisina verso bue in diluizione 1:333, ed 1 cmc. di sospensione 2:100 di globuli rossi di bue in soluzione fisiologica.

Si agitavano le provette di tanto in tanto.

Dopo 2 ore si praticava la lettura.

Indi si mettevano i tubi in ghiacciaia e si leggevano il giorno dopo.

Per rendere più comprensibile questa tecnica citerò un esempio: Supponiamo che nelle prove preliminari, nella 1.ª serie di 10 tubi, l'emolisi totale avvenga nel 4° tubo; ciò vorrà dire che l'unità alessinica della soluzione fisiologica, corrisponde a cmc. 0,40 di alessina 1 : 20; così supponendo che l'emolisi della 2.ª serie di 10 tubi, si verifichi al 5° tubo, e nella 3ª serie di 10 tubi, al 7° tubo, e nella 4ª serie di 10 tubi, al 6°, ciò significherà che l'unitá alessinica dell'antigene è pari a cmc. 0,50 di alessina, quella dell'anticorpo, a cmc 0,70, e quella del siero in esame, a cmc. 0,60.

Ciò premesso, nella prova definitiva bisognerebbe mettere nei sei tubi i seguenti quantitativi di alessina 1 : 20: nel 1° tubo: cmc 0,40; nel 2°: cmc. 0,50; nel 3°: cmc. 0,70; nel 4°: cmc. 0,60; nel 5°: cmc. 0,70, e cioè 0,50 (anticorpo) + 0,60 (siero) — 0,45 (soluzione fisiologica); e nel 6° cmc. 0,90, cioè 0,70 (antigene) + 0,60 (siero) - 0,40 (soluzione fisiologica)

Nei tubi 1°, 2°, 3°, 4°, della serie delle prove definitive: ci deve sempre essere emolisi; se questa non fosse completa le esperienze sarebbero ugualmente valide, purchè nel 5° e nel 6° tubo si osservasse inibizione dell'emolisi, molto più spiccata che nei primi quattro.

Nella lettura dei tubetti si può indicare convenzionalmente con un segno + una deviazione positiva, con due segni + una deviazione abbastanza spiccata e con tre segni +, una deviazione molto accentuata. Con uno o due o tre segni —, si può contrassegnare il fatto opposto. Dal grado più o meno spiccato della deviazione visibile, (quando è visibile), nei tubi 5° o 6°, si giudica della maggior o minor ricchezza in antigeni e rispettivamente in anticorpi, del siero o dell'estratto organico, presi in esame.

Batteriolisi in vitro — Si faceva una emulsione il più possibile omogenea, in soluzione fisiologica di bacilli tubercolari tratti da culture su patata, ed in una concentrazione tale, che 1 cmc. di emulsione, corrispondesse ad 1 mmgr. di bacilli secchi. Di tale emulsione si prendevano 2 cmc e si addizionavano rispettivamente ad 1 cmc. di siero puro, ad 1 cmc. di siero diluito in soluzione fisiologica nella proporzione 1:10, ad 1 cmc. di siero in soluzione 1:100, e così via fino alla soluzione 1:10 000

In tutti i tubi si aggiungeva 1/2 cmc. di alessina fresca in

soluzione fisiologica nella diluizione 1:20, con lo scopo di aumentare le unità complementari del siero dell' animale da esperimento (Wassermann e Freidberger)

Le diverse provette si ponevano in termostato, e da esse, si allestivano preparati microscopici, talvolta di 30 in 30 minuti, in genere, di ora in ora.

Batteriolisi in vivo. — Si iniettavano nel peritoneo di cavie sane, di peso inferiore ai 400 gr., 2 cmc. dell'emulsione bacillare, adoperata per la batteriolisi in vitro, insieme con un cmc. di siero di animali vaccinati, puro, e diluito in soluzione fisiologica, nelle proporzioni crescenti di 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, ed in certi casi, coll'aggiunta di 1/2 cmc. di alessina in soluzione fisiologica 1:20.

In alcuni animali, il siero veniva iniettato prima dei bacilli, in altri contemporaneamente, ed in altri dopo.

Con un tubetto capillare di vetro, si riprendeva dopo 1/2-1-2 ore, il liquido peritoneale e se ne facevano dei preparati microscopici, colorandoli come quelli delle prove batteriologiche in vitro, anzichè col metodo di Ziehl, col metodo di Weiss.

Questo non è altro che la combinazione dei due metodi di Ziehl e di Much. Il colorante è composto di 3 parti di liquido di Ziehl, e di una parte di violetto di metile; qualche volta conviene invece adoperare una parte di fucsina ed una parte di violetto, oppure 3 parti di violetto ed 1 di fucsina; si colora a caldo il preparato, fino a sviluppo di vapori come per lo Ziehl, poi si fa agire il liquido di Lugol per 5 minuti a freddo, per 1 minuto l'acido nitrico al 5 °/₀ o per 10 minuti l'acido cloridrico pure al 5 °/₀, indi si fanno agire alcool ed acetone a parti uguali, si asciuga con carta da filtro e si monta in balsamo con la solita tecnica.

Nel bacillo si mettono così in evidenza due sostanze, una colorabile colla fucsina, ed un'altra che prende il Gram, ed è prevalentemente costituita da sostanze albuminoidi. Quest'ultima appare sotto forma di granuli, per lo più, isolati, ma talvolta anche disposti in catena come bastoncini (Much).

Varia è l'interpretazione che si è data alle forme bacillari rilevabili con le diverse colorazioni dopo gli studi fatti in questo senso da Mircoli nella Clinica di Maragliano; Secondo Fontes, il

bacillo tubercolare sarebbe costituito da un involucro di sostanze cereo-adipose, entro cui esistono granuli Gram-resistenti Invece secondo Mircoli, Costantini ed altri, la forma granulare non sarebbe, come vorrebbe Much, la forma più resistente del bacillo tubercolare, il quale in alcune circostanze si spoglierebbe della sua acido-resistenza per poter meglio lottare e difendersi nel mezzo organico, ma dovrebbe essere considerata come una forma di germe attenuato, che può rivirulentarsi e dar luogo a delle forme a bastoncino acido-resistenti. Anche Tallo ritiene che le forme granulari, gramofile, siano la risultante di un processo di tubercolisi che si svolge sotto l'azione delle batteriolisine. In ogni modo, il metodo di Weiss è assai indicato per lo studio della batteriolisi, in quanto è con esso possibile osservare contemporaneamente ai fenomeni litici, le reazioni microchimiche dei bacilli, le cui forme Gram-resistenti, si possono considerare come forme bacillari attenuate.

Quando nei preparati da me allestiti dopo i saggi in vitro ed in vivo, si vedevano forme a rosario Gram-resistenti, si giudicava la batteriolisi come iniziata; e si considerava questa come accentuata, quando i preparati erano ricchi di forme gramofile, per lo più isolate, o, più raramente, riunite in brevi catenelle.

Resistenza all' intossicazione tubercolare. — Si adoperava tubercolina Maragliano (text-gift), a tossicità nota. Quella che io usavo era tale, che cmc. 0,60 di essa uccidevano 100 gr. di cavia adulta, in 4-5 giorni. Essa mi veniva fornita direttamente dall'Istituto Maragliano.

Calcolata quindi la dose di tossina da adoperare, in base al peso dell' animale su cui si sperimentava, si metteva a smaltire questa tossina in un volume di acqua distillata tale, che il volume complessivo del liquido da iniettarsi, non fosse mai superiore ai 4 cmc. La tossina, veniva introdotta direttamente nelle vene o sottocute; cercando in quest' ultimo caso, di far penetrare il liquido sotto la pelle in modo da formarvi una bozza lentamente riassorbibile.

Resistenza all'infezione tubercolare. — Si impiegavano per questo saggio, culture su patata di bacilli tubercolari virulentati mediante passaggio in scimmia. Queste culture avevano una virulenza nota, cioè nella dose di 1/10 di mmgr. di bacilli secchi am-

mazzavano un ettogramma di cavia adulta. Prima di adoperarle, si tenevano per qualche giorno in termostato, poi al momento dell'uso si diluivano in soluzione fisiologica sterile, in proporzione tale che 1 cm^3 della diluzione corrispondesse a 1/10 di mmgr. di bacilli, e di questa diluizione si iniettavano all'animale, la cui resistenza si voleva esaminare, tanti cm.^{3} quanti ettogrammi esso pesava

Tanto la resistenza all'intossicazione, quanto quella all'infezione, si saggiavano sugli animali adulti da 30 a 60 giorni dopo che essi avevano subito la vaccinazione e nei nati di madri vaccinate si controllavano in epoche più o meno lontane dalla nascita, a secondo delle ricerche che si volevano fare. A scopo di controllo, si praticavano sempre contemporaneamente, altre inoculazioni, con identiche dosi di tossine e di bacilli. ad altri animali della stessa specie o della stessa taglia. non vaccinati e sicuramente sani.

Agli animali che morivano spontaneamente si faceva l'autopsia subito dopo la morte. Quelli che sopravvivevano, si sacrificavano e si esaminavano in epoche variabili da 40 a 60 giorni dopo che erano stati inoculati.

Anafilassi. — Si praticava l'oftalmo-reazione o la cutireazione usando le tubercoline Maragliano che si adoperano comunemente a scopo diagnostico, in soluzione 1:500-1:1000. I saggi venivano compiuti su animali, i quali erano stati vaccinati non meno di un mese avanti e non più di due.

La sieroreazione positiva era dimostrata da rialzi termici sensibili, consecutivi all'iniezione di tubercolina L'oftalmo reazione si constatava nel solito modo, usando tubercolina Maragliano preparata a scopo diagnostico, cominciando da quella all'1 %$_0$ fino a quella al 2 %$_0$, analogamente a quanto venne praticato da Manfredi.

Reazione di Abderhalden. — Si mettevano in contatto secondo la tecnica nota, siero di sangue di animali vaccinati e bacilli tubercolari accuratamente lavati, i quali già avevano risposto negativamente ai saggi preliminari su di essi praticati con Nynidrin. Si adoperava per la ricerca dei fermenti protettivi, il metodo della dialisi.

Vaccinazione diretta del feto, dentro l'utero materno. — La

metodica seguita fu un po' differente da quella finora praticata dagli AA che si sono occupati dell'argomento. Si cercò sempre e sopratutto di evitare, più che fosse possibile, il passaggio di sostanze vaccinanti alla madre, durante la delicata manovra dell'innesto diretto sul feto.

Per questo genere di ricerche mi parvero più indicate le coniglie che le cavie, le quali, quando sono gravide, mostrano di sopportar meno bene delle prime, le operazioni sull'addome e sull'utero.

Le laparatomie si eseguivano con le più rigorose cautele di asepsi (guanti di gomma per le mani, materiale sterilizzato etc.).

Si depilava l'animale accuratamente, lungo un piccolo tratto della linea mediana dell'addome; indi si disinfettava tutto il campo operativo, con ripetute pennellature di alcool iodato.

Non fu mai necessario cloroformizzare od eterizzare gli animali. Il vaccino antitubercolare si emulsionava, prima dell'uso, in un vetrino da orologio, con un volume decuplo di soluzione fisiologica, per l'inoculazione nelle cavie, e con un volume quadruplo per l'inoculazione nelle coniglie. Dell'emulsione si iniettava a ciascun feto, 1/4 di cm.^{3}.

A tale scopo, si metteva allo scoperto con un'incisione delle pareti addominali sulla linea mediana, un po' sotto l'ombellico, il peritoneo, e lo si apriva per un piccolissimo tratto, con una forbice acuminata. Mediante opportune manovre digitali, eseguite attraverso le pareti addominali integre, si spingeva uno dei loculi uterini gravidi, contro l'occhiello esistente nel peritoneo. Non era difficile dopo che si era acquistata un po' di pratica, e quando la gravidanza era già un po' avanzata, di percepire attraverso i sottili tessuti materni, le diverse parti del corpo fetale, e di riuscire a spingere, sempre digitalmente e sempre attraverso le pareti uterine intatte, una di queste parti non vitali (arti inferiori, podice), fino in corrispondenza del foro esistente nel peritoneo. Allora, fissando con la mano sinistra, contro la breccia peritoneale, una di queste parti, vi si impiantava verticalmente un sottilissimo ago, che si era fatto penetrare nell'utero, tangenzialmente alla sua superficie e che si raddrizzava quando era giunto in contatto col feto.

Ciò fatto si innestava all'ago, una siringa da iniezione, precedentemente riempita del liquido vaccinante e lentamente si spingeva questo nel corpo fetale. Poi si disinnestava la siringa, ed all' ago rimasto infisso nel feto, si innestava una seconda siringa mediante la quale si faceva penetrare nei tessuti fetali, un piccolo quantitativo supplementare di soluzione fisiologica. Ciò con lo scopo di lavare completamente l'ago, prima di estrarlo dal feto, evitando così che la punta di esso nell'uscire, deponesse qualche piccola quantità di materiale vaccinante, in seno ai tessuti materni. Si estraeva rapidamente l'ago, toccandone talvolta con una fina punta di platino incandescente, il foro d'uscita. Si chiudevano con punta di sutura, a strati, il peritoneo e le pareti addominali.

In alcuni casi, furono aggiunte al vaccino piccole quantità di bleu di metilene, ed in altri, piccole quantità di inchiostro di china.

Nessuno degli animali operati ebbe mai fenomeni di peritonite.

Però i primi conigli operati, e quasi tutte le cavie, abortirono nelle prime ore, o nei primi giorni successivi alla laparatomia. Tutti gli altri invece, non manifestarono alcuna sofferenza dopo l'intervento, e continuarono senza incidente la loro gestazione, partorendo a termine feti vivi e vitali.

I.° Gruppo di esperienze

Esse avevano lo scopo di vedere se fosse possibile la trasmissione sperimentale, per via germinale, dell'immunità antitubercolare.

Sebbene rimaste incompiute, le riferisco perchè possano eventualmente essere confrontate con altre ricerche analoghe di altri osservatori.

a) *Trasmissione spermatica:*

Coniglio N. 1, maschio, grigio, gr. 3000.

10-II-915. - Si vaccina.

22-III » - Si salassa.

Esame biolog. del siero di sangue { antigeni: discreta quantità
anticorpi: discreta quantità

24-III-915. - Si immette per l'accoppiamento, in una gabbia, colla coniglia N. 2.

30-III » - Si immette per l'accoppiamento, in una 2ª gabbia colla coniglia N. 5.

20-IV » - Si infetta sperimentalmente con bacilli di Koch vivi e virulenti.

1-IV » - Si sacrifica: All'autopsia: rari tubercoli nel fegato. Gli altri organi sono sani.

Coniglio N. 2, femmina, grigia, gr. 3500.

22-III-915. - Si salassa.

Esame biolog. del siero di sangue { antigeni: / anticorpi: } negativi.

1-V-915. - La gravidanza da accoppiamento col maschio N. 1 termina col parto di 6 conigliotti vivi.

Conigliotto N. 1.

5-V-915. - Si inocula con bacilli tubercolari.

6-V- » - Si trova morto nella gabbia (?).

Conigliotto N. 2.

5-V-915 - Si inocula con tossina tubercolare.

6-V- » - Si trova morto nella gabbia (?).

b) *Trasmissione ovulare:*

Coniglio N. 3, maschio, nero; gr. 2500.

22-III-915. - Si salassa

Siero di sangue { antigeni: / anticorpi: } negativi.

24-III-915. - Si introduce, per l'accoppiamento, in una gabbia, con la coniglia N. 4.

Coniglio N. 4, femmina, scura, spalla destra bianca; gr. 3800.

17-II-915. - Si vaccina.

16-III- » Si salassa.

Siero di sangue { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: debole quantità.

29-IV-915. - La gravidanza da accoppiamento col maschio N. 3 termina col parto di 6 conigliotti vivi.
1-V- » - Si inocula con tossina tubercolare.
20-V- » - Si sacrifica. Reperto necroscopico negativo.

Conigliotto N. 1.

Conigliotto N. 2

1-V-915. - Si sacrificano.

Siero di sangue { antigeni: negativi.
anticorpi: traccie.

Conigliotto N. 3.

1-V-915. - Si inocula con bacilli.
7-V- » - Muore. Autopsia: Tubercolosi generalizzata.

c) *Trasmissione germinale mista*:

Coniglio N 5, femmina, bianca, spalla sinistra scura, gr. 3600.

17-II-915. - Si vaccina.
19-III » - Si salassa.

Siero di sangue { antigeni: debole quantità
anticorpi: discreta quantità.

3-V-915. - La gravidanza da accoppiamento col maschio N. 3 termina col parto di 5 conigliotti vivi.
6-V- » - Si inocula con bacilli tubercolari.
1-IV- » - Si sacrifica: Rari tubercoli nella milza. Gli altri organi sono sani.

Conigliotto N. 1.

Conigliotto N. 2.

6-V-915. Si sacrificano.

Siero di sangue { antigeni: negativi.
anticorpi traccie.

Conigliotto N. 3.

6-V-915. - Si infetta con tossina tubercolare.
10-V- » - Muore.

Secondo quanto sopra: I nati da padre vaccinato, e da madre non vaccinata, non presenterebbero nessuna maggiore resistenza all'infezione sperimentale, dei nati da genitori non immunizzati. Così i nati da padre non vaccinato e da madre vaccinata.

I nati da genitori entrambi vaccinati sarebbero invece gli unici che dimostrerebbero un leggiero aumento di resistenza in confronto coi precedenti.

Tanto nel sangue dei nati da madre vaccinata e da padre non vaccinato quanto in quello dei nati da genitori entrambi vaccinati, si troverebbero leggierissime traccie di anticorpi.

Mi riservo di continuare le esperienze riguardanti questa interessante questione; le osservazioni attuali sono troppo scarse per autorizzarmi ad alcun genere di conclusione.

II.° Gruppo di esperienze

Esse si proponevano il compito di studiare la trasmissione transplacentare di sostanze a funzione immunizzante, tanto dalla madre al feto, quanto viceversa, cioè dal feto alla madre.

A) Trasmissione transplacentare di sostanze salvanti dalla madre al feto.

I.ª SERIE

Questa I.ª serie si riferisce ad un certo numero di coniglie e di cavie, vaccinate in epoche diverse di gravidanza o durante il puerperio e l'allattamento per vedere quale influenza abbia lo stato di gravidanza sul modo di reagire dell' animale di fronte allo stimolo immunitario, e quale influenza eserciti sul prodotto del concepimento, l'introduzione di sostanze salvanti nella madre.

CONIGLI

Coniglio N. 1: Maschio, grigio, gr. 3000 (animale non vaccinato).

23-III. - Si salassa.

Siero di sangue { antigeni: / anticorpi: } negativi.

1-IV. - Inoculazione di tossina tubercolare.

1-V. - Muore in istato di grave deperimento generale. Autopsia: Enterite diffusa.

Coniglio N. 2: Femmina, grigia, gr. 3000 (F. gravida, non vaccinata).

20-III. - Si salassa fino a totale dissanguamento. Se ne adopera il sangue defibrinato per iniettare i conigli della serie 3ª, e se ne adoperano gli estratti placentari per iniettare i conigli della serie 2ª.

Coniglio N. 3: Femmina grigia, stella bianca in fronte, gr. 3100. (F. gravida, non vaccinata).

20-III. - Si salassa.

Siero di sangue { antigeni: / anticorpi: } negativi.

25-III. - Si infetta con bacilli vivi.

5-V. - Muore.

Coniglio N. 4: Femmina, grigia, gr. 3200. (F. puerpera, non vaccinata).

1-III. - E' puerpera di pochi giorni.

Le si danno ad allattare due coniglietti e cioè, uno dei proprî coniglietti, -*a*- ed un altro coniglietto -*b*- nato dalla coniglia N 6.

Un altro suo coniglietto -*d*-, si dà alla coniglia N. 6

23-III. - Si salassa.

Siero di sangue { antigeni: / anticorpi: } negativi.

Siero di latte { antigeni: / anticorpi: } negativi.

28-III. - Si infetta con bacilli vivi.

1-V. - Si sacrifica All'autopsia: Forte deperimento. Tubercolosi splenica ed epatica. Qualche tubercolo nella pleura.

Conigliotto -*a*-.

28-III. - Si sacrifica.

Siero di sague { antigeni: / anticorpi: } negativi.
n

Conigliotto -*b*-.

28-III. - Si sacrifica.

Siero di sangue { antigeni: negativi. / anticorpi: traccie.

Coniglio N. 5: Femmina, grigia, gr. 3800. (F. gravida, all'inizio vaccinata).

20-II. - Si vaccina.

16-III. - E' gravida a termine. Si salassa fino a totale dissangua, mento.

Esame del sangue: (Colorazione a fresco col Brillantcresylblau- ed a secco col May-Grünwalde Giemsa): Discreta copia di emazie ricche di sostanza prevalentemente filamentosa, ortocromatica. La formula di Arneth appare spostata verso sinistra. Discreta quantità di eosinofili. Qualche polimorfo nucleare a contenuto metacromatico. Qualche leucocito lipoforo.

Esame della milza e del midollo osseo: Discreta quantità di elementi giovanissimi rossi e bianchi.

Reazioni immunitarie del siero sanguigno:

Precipitazione: Debole.

Agglutinazione: Positiva nella diluizione 1:5.

Indice opsonico: 1,3.

Batteriolisi in vitro: Evidente dopo $1/2$ ora, nella diluzione 1:100.

Batteriolisi in vivo: Evidente dopo $1/2$ ora, nella diluizione 1:100; dopo 1 ora, nella diluizione 1:1000.

Reazione di Abderhalden: Traccie di peptone, rivelabili col Nynidrin, nel dialisato.

Reazione Bordet-Gengou: { antigeni: discreta quantità.
anticorpi: traccie evidenti.

Reazioni immunitarie negli estratti dei diversi organi materni:

Estratti di ovaio;

Reazione Bordet Gengou: { antigeni: } negativi.
anticorpi: }

Estratti di utero:

Reazione Bordet-Gengou: { antigeni: debolissime traccie
anticorpi: negativi

Estratti di plac nta:

Reazione Bordet-Gengou: { antigeni: discreta quantità.
anticorpi: debole quantità.

Estratti di milza:

Reazione Bordet-Gengou: { antigeni: traccie.
anticorpi: discreta quantità.

Estratti di fegato:

Precipitazione: Negativa.

Agglutinazione; Debolissima nella diluzione 1:5.

Indice opsonico: 0,82.

Reazione Bordet-Gengou: { antigeni: discreta quantità.
anticorpi: discreta quantità.

Batteriolisi in vitro: Discreta, dopo 1 ora, col siero puro e debole, dopo lo stesso tempo, colla diluizione 1:10.

Batteriolisi in vivo: Evidente dopo un'ora, col siero puro, e colla diluizione 1:10.

I feti estratti dalla madre mediante cesarizzazione, praticata immediatamente dopo il salasso della madre stessa, sono vivi, di peso e lunghezza normali.

Si sacrificano subito.

Esame del sangue, della polpa splenica e del midollo osseo. (Colorazione a fresco e con May-Grunwald e Giemsa o Leishman). Nulla di speciale.

Siero di sangue fetale: Reazioni immunitarie:

Precipitazione: Negativa.

Agglutinazione: Debole nella diluizione 1:5.

Indice opsonico: 0,75.

Reazione Bordet-Gengou: { antigeni: debole quantità. / anticorpi: discreta quantità.

Batteriolisi in vitro: Traccie dopo $1/2$ ora, evidente dopo 1 ora alla diluizione 1:100.

Batteriolisi in vivo: Evidente dopo $1/2$ ora, alla diluizione 1:100.

Reazione di Abderhalden: Debolissime traccie di peptone, svelabili col Nynidrin, nel dialisato.

Estratto di fegato:

Precipitazione: Negativa.

Agglutinazione: dubbia.

Indice opsonico: 0,62.

Reazione Bordet-Gengou: { antigeni: traccie evidenti. / anticorpi: traccie evidenti.

Batteriolisi in vitro: Traccie, dopo 1 ora, con siero puro

Batteriolisi in vivo: Traccie, dopo 1 ora, con diluizione 1:10.

Coniglio N. 6: Femmina, grigia, gr. 3600. (F. gravida, inizio gravidanza, vaccinata).

20-II-915. - Si vaccina

16 III » - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: debole quantità.

18-III » - Partorisce 6 conigliotti vivi.

Le si danno ad allattare 2 conigliotti, e cioè uno dei proprii,

conigliotto -c-, ed il conigliotto -d-, nato dalla coniglia N. 4. Un altro dei suoi conigliotti, conigliotto -b-, si dà ad allattare alla coniglia N. 4.

20-III-915. --

Siero di latte: { antigeni: traccie. / anticorpi: debole quantità.

25-III- » - Si infetta con bacilli vivi.
1-IV- » - Si sacrifica. All'autopsia: Rarissimi tubercoli nel fegato. Gli altri organi sono sani.

Conigliotto -c-.

28-III- » - Si sacrifica.

Siero di sangue: { antigeni: debole quantità. / anticorpi: discreta quantità.

Conigliotto -d-.

28-III-915. - Si sacrifica.

Siero di sangue: { antigeni: reazione incerta. / anticorpi: traccie.

Coniglio N. 7: Femmina, bianca e marrone, gr. 3300. (F. gravida, all'inizio, vaccinata).

17-II-915. - Si vaccina.
23-III » - Si salassa.

Reazioni immunitarie del siero di sangue:

Precipitazione: Debolissima.

Agglutinazione: Traccie colla diluizione 1:10; evidente colla diluizione 1:5.

Indice opsonico 1,2.

Reazione Bordet-Gengou: { Antigeni: discreta quantità. / Anticorpi: discreta quantità.

Batteriolisi in vitro: Evidente, dopo 1 ora, colla diluizione 1:100

Batteriolisi in vivo: Evidente, dopo 1 ora, colla diluizione 1:10; sensibile, dopo 2 ore, colla diluizione 1:100.

Reazione Abderhalden: Traccie di peptone nel dialisato.

29-III-915 - Oftalmoreazione.

30-III- » - Reazione positiva.

1-V- » - Si infetta con bacilli.

1-VI » - Si sacrifica. Radi tubercoli nella milza. Nulla negli altri organi.

Conigliotto -*e*-.

Conigliotto -*f*-

27-III- » - Si sacrificano:

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità.
anticorpi: discreta quantità.

Conigliotto -*g*-.

29-III- » - Oftalmoreazione.

30-III- » - Traccie di reazione.

Coniglio N. 8: Femmina, bianca, linea grigia sul dorso. (F. gravida, metà gravidanza, vaccinata).

19-II 915. - Si vaccina.

26-III » - E' puerpera di pochi giorni. Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: debole quantità.
anticorpi: debolissima quantità.

29-III- » - Sieroreazione.

30-III- » - Reazione incerta, pare positiva.

Conigliotto -*h*-.

Conigliotto -*i*-.

27-III- » - Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } traccie.

Conigliotto -*l*-.

29-III-915. - Siero-reazione.

30-III- » - Negativa.

Coniglio N. 9: Femmina, grigia, un taglio orecchio destro, gr. 2800. (F. gravida a termine, vaccinata).

17-II-915. - Si vaccina.
25-III- » - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: debolissime traccie.

6-IV- » - Si inocula con tossina.
28-IV- » - E' in buone condizioni. Si sacrifica. All'autopsia: Nulla.
Conigliotto -*m*-.
Conigliotto -*n*-.
29 III- » - Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni : traccie. / anticorpi: dubbi.

Coniglio N. 10: Femmina, nera, due spalle bianche, gr. 3300, (puerpera vaccinata).
17-II-915 - E' puerpera di 4 o 5 giorni. Si vaccina.
23-III- » - Ha terminato l'allattamento. Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: discreta quantità.

1-IV- » - Si infetta con bacilli vivi.
1-VI- » - E' un po' magra Si sacrifica. All'autopsia: Nulla
Conigliotto -*o*-.
1-IV- » - Si infetta con bacilli vivi.
28-V- » - Muore All'autopsia: Tubercolosi splenica Nulla agli altri organi
Conigliotto -*p*-
1-IV- » - Si inocula con tossina.
27-V- » - Muore. E' assai deperito All'autopsia: Nulla.

CAVIE

Cavia N 1: Maschio, bianco, marrone e nero, gr. 425 (animale non vaccinato).
22-III-915. - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } negativi.

1-IV-915 - Si infetta con bacilli vivi.
5-V- » - Si sacrifica. All'autopsia: Nessuna traccia di tubercolosi.

Cavia N. 2: Femmina, marrone, un taglio orecchio sinistro, gr. 380. (F. non gravida, vaccinata).
12-II-915. - Si vaccina.
22-III- » - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: debole quantità.

1-IV- » - Si infetta con bacilli vivi.
5-V- » - Si sacrifica. All'autopsia: Qualche tubercolo al punto d'innesto. Tubercolosi iniziale della milza. Gli altri organi sono sani.

Cavia N. 3: Femmina, musetto bianco, occhi neri, gr. 500. (F. non gravida, vaccinata).
17-II-915. - Si vaccina.
22-III- » - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: discreta quantità.

1-IV- » - Si infetta con bacilli vivi.
5-V- » - Si sacrifica All'autopsia: Tubercolosi splenica iniziale. Gli altri organi sono sani.

Cavia N. 4: Femmina, musetto rosso, occhio destro nero, gr. 450. (F. gravida all'inizio, non vaccinata).
20-III-915. - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } negativi.

26-III- » - Si infetta con bacilli vivi.
2-V- » - Ha precedentemente abortito, in epoca imprecisata. Muore. All'autopsia: Tubercolosi miliare diffusa.

Cavia N. 5: Femmina, marrone, un taglio orecchio sinistro, gr. 380 (Puerpera non vaccinata).

17-III-915. - E' puerpera di 4-5 giorni. Ha 5 caviotti vivi. Uno di questi, caviotto *-d-* si dà ad allattare alla cavia N. 6. Un secondo, caviotto *-a-*, è allattato dalla madre, insieme col caviotto *-b-*, proveniente dalla cavia N. 6.

26-III- » - Si infetta con bacilli vivi.

4-V- » - Muore. All'autopsia: Tubercolosi generalizzata.

Caviotto *-a-*.

1-IV- » - Si infetta con bacilli.

8-IV- » - Muore.

Caviotto *-b-*.

1-IV- » - Si infetta con bacilli.

26-IV- » - Muore.

Cavia N. 6: Femmina bianca, chiazzata di nero, gr. 408. (F. gravida all'inizio, vaccinata).

19-II-915. - Si vaccina.

16-III- » - E' puerpera di 4 giorni, ha 6 caviotti vivi. Uno di questi, caviotto *-b-*, si dà alla cavia N. 5. Un secondo caviotto, caviotto *-c-*, è allattato dalla madre, insieme col caviotto *-d-*, proveniente dalla cavia N. 5.

22-III- » - Si inocula con tossina (dose doppia).

28-IV- » - Sta bene E' nuovamente gravida.

20-V- » - E' sopravissuta.

Caviotto *-c-*.

22-III- » - Si infetta con bacilli.

8-IV- » - E' assai deperito Si sacrifica. Tubercolosi epatica. Gli altri organi sono sani.

Caviotto *-d-*.

22-III- » - Si infetta coi bacilli.

8-IV- » - Si trova morto.

Cavia N. 7: Femmina, bianca a destra, nero e marrone a sinistra, gr. 390. (F. gravida all'inizio, vaccinata).

19-II-915. - Si vaccina.

16-III-915 - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni : discreta quantità.
anticorpi: debole quantità.

24-III- » - Si cesarizza. Muore dopo l'operazione. I caviotti sono vivi e si sacrificano immediatamente, dopo che si sono estratti dall'utero.

Caviotto -*e*-.

Caviotto -*f*-.

24-III- » - Siero di sangue: { antigeni : deboli quantità.
anticorpi: traccie appena evidenti.

Cavia N. 8: Femmina, metà destra bianca, metà sinistra in parte caffè (F. gravida, inizio, vaccinata).

19-II-915. - Si vaccina.
16-III » - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità.
anticorpi: debole quantità.

24-III- » - Si cesarizza. Muore poco dopo l'operazione. I caviotti nati vivi, si sacrificano immediatamente, dopo che si sono estratti dall'utero.

Caviotto -*g*-.

Caviotto -*l*-.

24-III- » - Siero di sangue: { antigeni : debole quantità.
anticorpi: debole quantità.

Cavia N. 9: Femmina, nera e marrone, gr. 450. (F. gravida 1ª metà, vaccinata).

17-II-915. - Si vaccina.
22-III- » - E' puerpera da pochi giorni. Si infetta con bacilli vivi.
5-V- » - Si sacrifica. E' nuovamente gravida. Non presenta traccie di tubercolosi.

Caviotto -*g*-.

1-IV-915 - Si infetta con bacilli vivi.
5-V- » - Si sacrifica. Non è tubercoloso.

Caviotto -*l*-.

1-IV- » - Si inocula con tossina
1-V- » - Sopravvive.

Cavia N 10: Bianca e nera, spalla destra bianca, gr 430, (F. gravida 2ª metà, vaccinata).
17-II-915. - Si vaccina.
20-III- » - E' puerpera di pochi giorni. Si salassa.

Siero di sangue { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: discreta quantità.

26-III » - Si inocula con tossina
5-V-915. - Sopravvive.

Caviotto -*m*-.

20-III- » - Si infetta con bacilli.
26-III- » - Muore.

Cavia N. 11: Femmina, nera e caffè, orecchio d. bianco, gr. 500 (F. puerpera, vaccinata)
17-II 195. - E' puerpera di pochi giorni.
20-III- » - Si infetta con bacilli.
28 V- » - Si sacrifica. All'autopsia: Nulla.

Caviotto -*m*-.

20-III- » - Si infetta con bacilli.
26-III- » - Muore.

Cavia N. 12: Femmina, color marrone, gr. 410 (F. puerpera, vaccinata).
17-II-915 - É puerpera di pochi giorni.
26-III- » - Si infetta con bacilli.
28-V- » - È nuovamente gravida Si sacrifica. All'autopsia: Nulla.

Da questa prima serie di ricerche, sulla trasmissione materno-fetale di sostanze a funzione immunizzante, attraverso la placenta, emergono i seguenti fatti:

In generale non esiste differenza sensibile tra il modo di comportarsi dei conigli e quello delle cavie, di fronte alla vaccinazione antitubercolare, praticata durante la gravidanza od il puerperio.

Lo stato di gestazione non influisce in modo considerevole sul grado della reazione locale che si manifesta dopo l'introduzione sottocute di materiale tubercolare. L'infiltrazione cutanea che compare quasi sempre dopo l'innesto ipo od intradermico di vaccino, si riassorbe in pochi giorni, senza lasciare traccie degne di rilievo. Talvolta, ma raramente, permane un limitato indurimento locale, che non si conserva però mai più di 10 giorni Non ho mai osservato reazioni ghiandolari a distanza. Non ho mai avuto occasione di sperimentare quale influenza eserciti sull'andamento della reazione immunitaria, l'ablazione, pochi giorni dopo l'innesto, della bozza vaccinica ipodermica e cioè di studiare, se la sottrazione improvvisa dall'organismo, del focolaio di antigeni tubercolari, ivi artificialmente provocato, minori la resistenza dell'organismo stesso, di fronte al bacillo tubercolare come Morelli ha visto, avvenire nei soggetti sottoposti ad inoculazioni di emulsioni bacillari, i quali peggioravano quandosi asportavano loro gli ascessi che si erano format nel luògo dell'iniezione.

Le curve termiche non furono da me sistematicamente seguite perchè, dall'esame dei protocolli di De Blasi e di Martelli, avevo riportato l'impressione che esse non avessero un importanza molto grande, come indicatrici dell'andamento generale della reazione immunitaria. Per la stessa ragione non tenni conto della curva ponderale. ma ogni animale o giovane o adulto, fu pesato con cura. sia prima di essere vaccinato, che prima di essere infettato con bacilli vivi, o inoculato con tossina tubercolare, perchè come già si disse nella descrizione della metodica dei diversi saggi, i bacilli e le tossine venivano iniettati *in dosi proporzionali al peso dell'animale su cui si sperimentava.*

In occasione di queste pesate, fu possibile osservare che, indipendentemente da altri fattori, come il parto, l'allattamento ed i salassi precedenti e ripetuti, la curva ponderale accennava a discendere nel primo mese, dopo la vaccinazione, per risalire dal 35° giorno in su, fino al punto di partenza ed oltre.

L'esame istologico del sangue e degli organi ematopoietici,

fatto negli animali non precedentemente salassati (poichè il salasso influisce sulla crasi sanguigna), dimostrerebbe tanto nei conigli quanto nelle cavie, specie nei primi, un reale processo eccito-formativo, sopratutto rispetto agli elementi rossi del sangue. Ciò risulterebbe non tanto dall'iperglobulia, da me raramente notata, quanto dalla presenza nel sangue circolante, nel midollo osseo, ed in parte, anche nella polpa splenica, di forme eritrocitiche giovanili, e precipuamente di emazie contenenti sostanza filamentosa ortocromatica.

Quanto agli elementi della serie bianca, io avrei notato accanto ad un leggero aumento numerico dei mononucleari e dei polimorfonucleari eosinofili, una netta tendenza a spostarsi verso sinistra della formula di Arneth, e con la colorazione a fresco (bleu di cresile e Sudan III), la presenza di un certo numero di polimorfonucleari, contenenti granuli metacromatici e di qualche raro elemento lipoforo (leucociti sudanofili)

Anche nel midollo osseo e nella polpa splenica, apparivano più frequenti che negli animali non vaccinati, quegli elementi, sopratutto della serie scolorata, che sogliono essere considerati, come forme giovanili.

Non ho mai praticato nel corso di queste ricerche ematologiche, la leuco-diagnosi di Achard e Bènard, perchè mentre essa era stata dapprima giudicata capace di fornire qualche ragguaglio, intorno al grado di resistenza dell'organismo, in questi ultimi tempi dagli stessi AA. che l'avevano proposta, era stata riconosciuta come insufficiente allo scopo.

Mi riprometto invece di eseguire nel sangue delle donne vaccinate fuori di gravidanza e durante la gestazione, la reazione di Winkler-Schultze, cioè la ricerca (mediante il trattamento degli strisci di sangue con naftolo o parafenilendiamina), di granuli di ossidasi nei leucociti, granuli che Sambalino riterrebbe atti a fornire qualche indicazione intorno al grado della reazione difensiva organica.

Credo per contro trascurabile, sotto questo punto di vista, la reazione di Neumann e Hermann, la quale, secondo tali AA. rivelerebbe il contenuto in colesterina ed in lipoidi del sangue della gravida, e con esso il grado della difesa organica, mentre osser-

vazioni posteriori di Galfami, Cova, Bolaffio ed altri hanno dimostrato che del solo fatto della colesterinemia, non si può arguire che la gravida, presenti un aumento di poteri difensivi di fronte agli agenti patogeni.

Delle diverse reazioni biologiche che si adoperano nella pratica odierna di laboratorio per mettere in evidenza i poteri difensivi specifici di un determinato siero di sangue, quella di Bordet-Gongou, fu da me praticata con assai maggior frequenza delle altre, per i motivi già precedentemente esposti.

Alcune volte, cimentai anche, colle reazioni immunitarie, non solo il siero di sangue degli animali gravidi vaccinati, e quello dei loro nati, ma anche il siero di latte, e gli estratti dei principali organi materni e fetali.

Scarsamente probativi, talora anche dubbi, furono i risultati da me ottenuti con le reazioni di precipitazione e di agglutinazione. Non ebbi però occasione di sperimentare il metodo di precipitazione proposto da Micheli, e che secondo le recenti indagini di Civalleri, sarebbe capace di mettere in evidenza, minime traccie di antigene tubercolare.

Così mi riservo di studiare se, a somiglianza di quant'altri AA. (Vallée, Finzi, Jousset, Morelli), hanno visto avvenire col siero sanguigno di individui tubercolosi, il siero sanguigno di donne vaccinate, dia luogo a precipitazione quando venga messo in contatto col siero sanguigno di animali iperimunizzati.

Può anche darsi che l'incertezza dei miei reperti sia dovuta al non aver io adoperato, come uno degli elementi della precipitoreazione e della agglutinoreazione, lo stesso vaccino che aveva servito per inoculare l'animale, o lo stesso stipite di bacillo tubercolare, che era stato impiegato per la preparazione del materiale vaccinante.

Nemmeno l'indice opsonico fu sempre corrispondente al grado di resistenza dimostrato più tardi dall'animale, di fronte all'infezione sperimentale. Ciò però non fa meraviglia, perchè sebbene Romanelli abbia visto indici opsonici più elevati della norma, in soggetti malati di tubercolosi poco avanzata, e indici opsonici più bassi della norma, in individui affetti da tubercolosi molto avanzata, altri lavori pubblicati sull'argomento, hanno dimostrato che già

nell' individuo sano, l' indice opsonico verso la tubercolosi è relativamente elevato, tanto nella madre quanto nel feto, ma sopratutto nella madre, e che nei neonati di madri tubercolose, non è infrequente un notevole e costante abbassamento della curva opsonica (Agazzi).

Un po' più dimostrativi furono i risultati delle prove batteriolitiche in vitro, ma sopratutto in vivo. I preparati microscopici, allestiti di ora in ora, rivelarono nei bacilli posti a contatto con siero di animali vaccinati, uno spiccato processo litico, in media dopo un' ora, e talora anche meno, già quando il siero era impiegato in diluizione 1:100. La batteriolisi era tanto più rapida e tanto più accentuata quanto più lontana, dal momento in cui si saggiava il siero, era l' epoca in cui l' animale aveva subito la vaccinazione.

In un caso, nel quale si eseguì la batteriolisi « in vivo », introducendo prima nel peritoneo delle cavie, il siero dell' animale vaccinato e poi i bacilli tubercolari, il disfacimento bacillare non apparve nè più spiccato nè più precoce di quando il siero si introduceva contemporaneamente ai bacilli.

In tutti questi saggi, il metodo di Weiss, risultò capace di fornire buone indicazioui intorno al grado di disfacimento dei bacilli tubercolari.

Le cavie, nelle quali erano state eseguite le prove di Pfeiffer, in alcuni casi furono sacrificate subito dopo il saggio; in altri casi, sopratutto in quelli, nei quali erano stati impiegati sieri poco diluiti, furono lasciate in vita. Esse morirono tutte in seguito, più o meno rapidamente, con fatti tubercolari generalizzati, ma duè o tre di esse, più lentamente delle altre e con lesioni specifiche localizzate ai soli organi addominali.

La reazione anafilattica fu pure praticata in alcuni conigli, madri e feti, mediante l' oftalmoreazione, ed in altri conigli pure madri e feti, mediante la sieroreazione, seguendo la tecnica già adoperata da Manfredi nella Clinica di Genova. Tranne che in un neonato di un coniglio, i risultati, sebbene non molto accentuati, furono tuttavia positivi, e più lo sarebbero forse stati, se i saggi si fossero instituiti in epoche meno vicine all' avvenuta vaccinazione.

La reazione di Abderhalden, doveva essere praticata, in grande, sul siero sanguigno delle donne vaccinate Negli animali ebbe solo il carattere di ricerca preliminare. Essa sortì in un caso, esito positivo ed in un secondo, effetto dubbio. Siccome per questa reazione, si devono utilizzare bacilli tubercolari, coltivati su terreni riechi di albumina, è sempre difficile poter escludere che sussistani traccie di peptone nelle emulsioni bacillari adoperate come reagente per la dimostrazione dei fermenti protettivi nel sangue dei vaccinati. Nondimeno adoperando, come ho fatto io, queste emulsioni bao cillari, dopo che avevano risposto negativamente ai saggi preliminar- col Nynidrin, si poteva sperare di escludere tale causa di errore. Ed allora, prescindendo dall' azione inibitrice, che può essere esercitata dall' involucro cereo-adiposo del bacillo, il risultato eventualmente positivo di qualcuna di queste reazioni, potrebbe essere interpretato come l' esponente della presenza nel sangue dei vaccinati, di fermenti capaci di elaborare l' albumina dei bacilli tubercolari. Ciò corrisponderebbe in parte a quanto ha osservato Decio, che cioè il siero di sangue di ammalati di tubercolosi miliare, è in grado di digerire gli albuminoidi preparati da culture di bacilli tubercolari.

Accenno di passaggio a quattro altre ricerche da me praticate sul siero di sangue di qualcuno degli animali sopraelencati, e che non ho riferito in dettaglio sui protocolli per l' eseguità del nu mero dei saggi instituiti.

Intendo parlare della reazione di Rivalta, della reazione del veleno del cobra, della reazione meiostagninica e della prova della cancerolisi.

La reazione di Rivalta, consistente nell'intorbidamento provocato dal siero in esame diluito in carbonato sodico e versato a goccia entro una soluzione acetica, rivelerebbe secondo Bruni, Pestalozza, Cavagnis, quando è positiva, la presenza di globuline nel sangue, ed avrebbe un certo interesse nel caso nostro, perchè alle globuline si attribuisce da molti, il valore di indici di difesa organica.

La reazione del veleno del cobra, avrebbe lo scopo di studiare se, in rapporto col suo eventuale contenuto lecitinico, al quale si attribuisce da molti una funzione protettiva generica per l'organismo,

il sangue dei soggetti vaccinati sia cobraattivante, come Guicciardi e Fornario hanno visto essere quello dei malati di tubercolosi e delle donne gravide, e se essendo cobraattivante, lo sia in misura maggiore o minore del sangue dei tubercolosi, o di quello delle donne gravide.

La reazione meiostagminica, si prefiggerebbe il compito di verificare se il siero di sangue dei soggetti vaccinati, messo in contatto con antigeni tubercolari, risponda positivamente allo stalagmometro a somiglianza di quanto alcuni AA. hanno visto avvenire nel siero sanguigno di individui affetti da malattie tubercolari (Abbo, Bertolini).

La prova della cancerolisi (Kraus e Graff), si proporrebbe di indagare se il sangue dei soggetti vaccinati, possiede la proprietà anche recentemente riscontrata da Manna nel sangue dei tubercolosi, di sciogliere le cellule cancerose, mentre il sangue di individui affetti da carcinoma, non la possiede.

Tutte queste ricerche furono da me praticate, come già ho detto, in un numero molto limitato di animali, più che altro per servire come confronto ad altre analoghe instituite e da instituirsi su donne vaccinate. Delle une e delle altre, riferirò prossimamente.

Assai più numerose furono le prove da me eseguite sugli animali vaccinati, con la reazione di Bordet-Gengou, modificata secondo la tecnica usata nella Clinica di Genova.

Oltre che sul siero sanguigno materno e fetale e sul siero di latte, questi saggi furono anche praticati su estratti di organi diversi della madre e del feto. E' noto difatti, che accanto ad una immunità umorale, esiste un'immunità istogena, dovuta a ciò che anche gli elementi dei parenchimi e dei tessuti in genere, sono in grado di attenuare la tossicità delle sostanze di origine batterica colle quali vengono in contatto. Del resto, anche nel campo ostetrico, è ormai da tempo dimostrata l'azione protettiva esercitata dal fegato, di fronte al bacillo della tubercolosi, ed alle sue tossine (Costa, Jascone etc.).

Negli estratti organici degli animali vaccinati, la fissazione del complemento rivelò la presenza di antigeni negli estratti di placenta, di utero e di fegato materni, e nell'estratto di fegato fetale, e fornì invece reperto negativo negli estratti di ovaio e di

milza materni; mise in evidenza la presenza di anticorpi negli estratti di placenta e negli estratti di fegato e milza materni, e negli estratti di fegato fetali; non svelò invece esistenza di anticorpi negli estratti di utero e di ovaio materni.

In complesso, l' intensità della reazione immunitaria, almeno per ció che è rilevabile colla fissazione del complemento, seguirebbe questo ordine decrescente: Estratti di placenta e di fegato materni, estratti di fegato fetale, estratti di milza e di utero e di ovaio materni.

Dei diversi liquidi organici, solo il siero di sangue e quello di latte furono da me saggiati col metodo di Bordet-Gengou, modificato da Gardi e Sivori.

È noto che dopo l' introduzione nell' organismo di materiali a funzione immunizzante, compaiono, a scadenza più o meno lunga ed in misura più o meno spiccata, prodotti specifici dimostrabili colla fissazione del complemento, nei diversi liquidi organici quali l' orina, la linfa, il liquido cefalo-rachidiano, la saliva, il sudore, i liquidi endoculari (Laganà). Ma queste ultime ricerche si possono pressochè esclusivamente praticare nelle donne vaccinate, piuttosto che negli animali, sopratutto in quelli di piccola taglia.

Come risulta dai protocolli, i saggi biologici relativi al siero di sangue, ed al latte furono fatti nei diversi animali, da 35 a 65 giorni, in media, dopo la vaccinazione, cioè un po' prima a rigor di termine che la reazione immunitaria avesse raggiunto il suo completo sviluppo.

Ciò malgrado, i reperti furono sempre abbastanza netti, tanto per ciò che concerne il contegno degli antigeni, quanto per ciò che si riferisce agli anticorpi.

Però l' intensità della reazione, fu qualche volta, nei miei animali, leggermente diversa da quella ottenuta in ricerche analoghe da Martelli.

Infatti, non sempre, negli animali, anche se vaccinati solo una trentina di giorni prima, io trovai quantitativi di antigeni superiori a quelli degli anticorpi, anzi non di rado, ebbi quantitativi diantigeni e di anticorpi, presso a poco uguali fra loro. Invece, e questo è in perfetto accordo coi reperti di Martelli, solo eccezionalmente vidi il contenuto degli anticorpi, superare quello degli

antigeni. Le ricerche di controllo, istituite parallelamente su animali non gravidi, non vaccinati, e su animali gravidi, non vaccinati, diedero risultati negativi, mentre le contemporanee prove fatte sugli animali non gravidi, vaccinati, davano reperti positivi. Fù sempre chiaramente dimostrabile, l' influenza dello stato di gravidanza sulla maggior o minor ricchezza in antigeni ed in anticorpi degli animali vaccinati, ed anche ciò si accorda coi risultati di Martelli.

Anch' io vidi che negli animali i quali erano stati vaccinati verso la metà della gravidanza, la reazione risultava più intensa che in quelli i quali avevano subito la vaccinazione in principio od alla fine della loro gestazione.

Negli animali vaccinati durante il puerperio, il contenuto del sangue in antigeni ed anticorpi, parve tanto maggiore quanto più lontana dal parto era stata la vaccinazione.

Questi miei reperti, troverebbero un conforto sperimentale nelle ricerche di Palmelli, il quale avrebbe osservato che le iniezioni di chenotossine, cioè di tossine artificialmente preparate dai muscoli affaticati, produrrebbero un abbassamento dei poteri difensivi del siero. Da questa constatazione, Palmelli è indotto a ritenere che nell'affaticamento, siano le chenotossine, che inibiscono all' organismo la produzione delle agglutinine, delle opsonine, delle batteriolisine etc.

E' facile quindi pensare che, come la fatica muscolare è capace di abbassar l' indice di reazione organica, così la fatica del parto, che in parte è anche fatica muscolare, contribuisca in misura non indifferente a diminuire nei soggetti vaccinati, le attività produttrici dei principii salvanti, e ciò non solo durante il travaglio vero e proprio, ma anche nel periodo immediatamente successivo e quindi nei primi giorni di puerperio.

Tutti questi fatti furono più manifesti nei conigli che nelle cavie. E questo conferma quanto Martelli, seguendo l'indirizzo dato da Sivori, ha dimostrato, sulla influenza del parto nel decorso della reattività organica

Nel prodotto del concepimento, il saggio biologico fornì sempre reperti negativi, quando la madre non aveva subito trattamento immunizzante; quando questa invece era stata vaccinata, tranne qualche eccezione, furono sempre rintracciabili nel sangue dei neonati, antigeni ed anticorpi.

Il rapporto reciproco tra gli uni e gli altri, presentò oscillazioni notevoli da caso a caso e perciò non è possibile stabilire se siano di regola più abbondanti i primi od i secondi. Nei feti esaminati poco tempo dopo che la madre era stata immunizzata e sopra tutto nei feti estratti con taglio cesareo, nel corso stesso della gestazione, il contenuto di antigeni superò nettamente quello degli anticorpi; nei nati invece da madre vaccinata all' inizione della gravidanza, il contenuto in antigeni mostrò una certa tendenza a mantenersi parallelo a quello degli anticorpi

Il quantitativo globale degli antigeni e degli anticorpi parve, nei nati da madri vaccinate al principio della gravidanza, un po-superiore a quello dei nati da madri immunizzate verso la metà ed alla fine della gravidanza. Anche questo fatto assume maggior evidenza nei conigli che nelle cavie.

Nel siero di latte degli animali vaccinati, i radi esami da me praticati, esclusivamente nei conigli, rivelarono un contenuto piuttosto modesto di antigeni e di anticorpi, specialmente di antigeni.

Nei nati da madri non vaccinate ma allattati da femmine non vaccinate, gli antigeni e gli anticorpi, sebbene un po' più abbondanti dei precedenti, furono tuttavia sempre visibili, in quantità piuttosto deboli; però in questi casi vi fu quasi sempre pareggio tra antigeni ed anticorpi. In discreta copia invece, furono rintracciati gli antigeni e gli anticorpi nel sangue di nati da madri vaccinate, e da queste direttamente allattati, ma anche in questi animali, non vi fu sbilancio sensibile tra gli antigeni e gli anticorpi, anzi in qualche raro caso, questi ultimi superarono i primi.

Queste ricerche sull' influenza dell' allattamento sulla vaccinazione, confermerebbero l' opinione di Martelli, che nel siero sanguigno dei nati da animali vaccinati e allattati dalla propria madre, gli antigeni e gli anticorpi che questi nati ricevono dalla madre attraverso la placenta, si sommino con quelli che pervengono loro dalla via gastro-enterica per mezzo del latte.

Le esperienze sulla resistenza degli animali vaccinati all' infezione sperimentale con bacilli vivi e virulenti ed alla intossicazione sperimentale con veleni tubercolari a tossicità nota, fornirono risultati abbastanza concordi, e molto spesso armonizzanti con quelli offerti dagli altri saggi biologici.

In generale, gli animali vaccinati in epoche diverse della loro gravidanza, o durante il puerperio, e trattati con bacilli vivi o con tossine tubercolari da 45 a 65 giorni dopo che avevano subito l'innesto vaccinico, sopravvissero conservandosi indenni da tubercolosi, oppure si ammalarono di forme viscerali, prevalentemente spleniche od epatiche, le quali mostravano scarsa tendenza a peggiorare. Invece i controlli della stessa specie e della stessa taglia, inoculati con dosi equipollenti degli stessi bacilli o delle stesse tossine, morirono da 20 a 40 giorni dopo il trattamento, oppure si ammalarono di forme tubercolari ad andamento rapido e con spiccata tendenza alla generalizzazione.

I feti degli animali vaccinati, palesarono, con una certa frequenza, una resistenza all'infezione ed all'intossicazione tubercolare maggiore di quelli provenienti da madri non vaccinate e questo aumento di resistenza appare tanto più accentuato, quanto più lontana dall'infezione o dalla intossicazione sperimentale era l'epoca in cui la loro madre era stata immunizzata.

I nati da animali non vaccinati, ma allattati con latte di animali vaccinati, non rivelarono nessuna maggior resistenza all'infezione ed all'intossicazione di quelli nati da madri non vaccinate ed allattati con latte di animali pure non vaccinati.

Invece un aumento di resistenza fu manifesto alcune volte nei nati da madre vaccinata, allevati con latte di femmina non vaccinata, ed anche più sensibile fu l'aumento di resistenza dimostrato dai figli di madri vaccinate, allevate da queste ultime.

I nati da femmine vaccinate durante il puerperio, si comportarono di fronte all'infezione ed all'intossicazione sperimentale presso a poco come i figli di femmine non vaccinate.

Tutti questi fenomeni furono da me riscontrati tanto nei conigli quanto nelle cavie ed i risultati ottenuti nelle esperienze condotte su quest'ultime, acquistano un interesse speciale, data la grande sensibilità di questi animali ai bacilli tubercolari ed alle loro tossine.

II.ª SERIE

Questa seconda serie di esperienze, sempre sulla trasmissione transplacentare di sostanze a funzione immunizzante dalla madre

al feto, fu condotta su coniglie e su cavie gravide, in diverse epoche della loro gravidanza, associando alla vaccinazione, l' introduzione nell' organismo materno di estratti di placenta di animali della stessa specie. Gli estratti placentari si iniettavano sottocute contemporaneamente al vaccino antitubercolare, oppure antecedentemente, od anche consecutivamente a questo.

Si univano questi estratti di placenta al materiale immunizzante, con lo scope di vedere se introducendo nell'organismo che si voleva vaccinare, sostanze organiche di origine ovulare, ed introducendo così artificialmente, in esso organismo, un anmento dello stato autotossico proprio della gravidanza, si riusciva ad influenzare in qualche maniera la produzione di sostanze salvanti nella madre, ed il passaggio di queste nel feto e si riusciva quindi ad influirr in un modo o nell'altro sulla resistenza della madre e del feto all' infezione ed all' intcssicazione tubercolare sperimentale.

CONIGLI

Coniglio N. 1. - Femmina, grigia, collo bianco, orecchio S. roseo gr. 3500 (F. gravida, all'inizio, trattata prima con estratto placentare, poi con vaccino).

17-XI-915 - Si inietta sottocute 1 cmc. di estratto di placenta di coniglia.
22-II-915. - Si vaccina.
23-III » - E' puerpera di pochi giorni. Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: traccie.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi.
30-IV » - Muore. All'autopsia: Peritonite tubercolare, focolai di tubercolosi nei visceri pelvici.

Conigliotto -*a*-.

Conigliotto -*b*-.

25-III » - Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. / anticorpi: traccie.

Conigliotto -*c*-.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi
10-IV » - Muore.

Coniglio N. 2: Femmina, grigia, un taglio orecchio sinistro, gr 3400. (F. gravida, all'inizio, trattata contemporaneamente con estratto placentare e vaccino).

17-II-915. - Si inietta sottocute una miscela di estratto placentare 1 cm.^{3} e di vaccino (solita dose).
23-III » - E' puerpera di pochi giorni. Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: traccie.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi.
1-IV » - Si sacrifica. All'autopsia: Forte deperimento génerale; tubercolosi epatica e splenica.

Conigliotto -*d*-.

Conigliotto -*e*-.

25-VII » - Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. / anticorpi: traccie.

Conigliotto -*f*-.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi.
9-IV » - Muore.

CAVIE

Cavia N. 1: Femmina, occhio destro nero, musetto rosso, gr. 360. (F. gravida, all'inizio, trattata prima con estratto placentare e poi con vaccino).

1-III-915. - Si inietta sottocute un cm.^{3} di estratto di placenta.
3-III » - Si vaccina.

24-III » - Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. / anticorpi: traccie appena visibili.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi.
30-IV » - Si sacrifica. All'autopsia: Milza grossa con tubercolosi iniziale; rari tubercoli nel fegato.

Caviotto -*a*-.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi.
20-IV » - Muore.

Caviotto -*b*-.

1-IV » - Si inocula con tossina.
22-IV » - Muore

Cavia N. 2: Femmina, musetto bianco, occhio destro nero, . 370 (F. gravida, all'inizio, trattata prima con vaccino e poi con estratto placentare).

17-II-915. - Si vaccina
22-II- » - Si inietta sotto cute 1 cm.^{3} di estratto placentare di di cavia.
22-III » - E' puerpera di pochi giorni. Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. / anticorpi: debolissime traccie.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi.
2 V » - Muore.

Caviotto -*c*-.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi.
26-IV » - Muore.

Il confronto di questi protocolli con quelli della prima serie di esperienze, farebbe pensare che l'associazione al vaccino di estratto di placenta, eserciti una specie di inibizione sulla comparsa in circolo di antigeni e sopratutto di anticorpi tubercolari, e sull'aumento di resistenza all'infezione ed all'intossicazione sperimentale, che, come abbiamo visto, consegue all'introduzione di

vaccino puro. La reazione organica, di fronte allo stimolo immunitario, subisce press' a poco le stesse modificazioni, tanto nei conigli che nelle cavie

Così pure, non esisterebbero differenze sensibili, tra l'influenza esercitata sulla reazione immunitaria dalla introduzione preventiva, rispetto al vaccino, dell' estratto placentare, e quella esercitata dall' inoculazione contemporanea di estratto placentare e di vaccino; invece l' introduzione dell'estratto, fatta in tempi successivi a quelli della vaccinazione, inibirebbe la reazione immunitaria, in modo assai meno marcato.

Gli stessi fenomeni si verificherebbero su per giù nel prodotto del concepimento, il quale contiene minor quantità di antigeni e di anticorpi nel proprio sangue, e dimostra minor resistenza alla tubercolosi sperimentale, quando proviene da una madre trattata con vaccino associato ad estratto placentare, di quando discende da una madre, inoculata col solo vaccino.

Invece le piccole differenze di reazione immunitaria e di resistenza all' infezione, rintracciabili nelle madri, a seconda che la vaccinazione è preceduta, piuttosto che accompagnata o seguita dall' iniezione di estratto placentare, non sono rilevabili nel feto

Le esperienze di questa II SERIE, non sono ancora in numero sufficiente per permettere rilievi di qualche importanza. Esse dovranno essere condotte più in grande, e contemporaneamente ad altre, nelle quali la vaccinazione, sia preceduta, od accompagnata, o seguita da introduzione di sostanze tossiche di origine non ovulare, per vedere se l' influenza inibitrice, esercitata sulla vaccinazione, dall' associazione di estratto placentare al materiale tubercolare immunizzante, sia realmente imputabile ad un aggravamento da noi prodotto nello stato autotossico gravidico, o non sia semplicemente dovuta a quella diminuzione di energia difensiva che viene indotta nell' organismo, dalla comparsa in esso di sostanze velenose in genere, indipendentemente dalla loro origine e della loro natura.

Le osservazioni cliniche e sperimentali, eseguite finora in altri campi, provano in modo indubbio che i veleni di origine ovulare tendono a minorare la resistenza organica durante la gravidanza, e così anche nel campo nostro, le esperienze dei diversi AA. hanno

dimostrato che durante la gravidanza, gli animali vaccinati rispondono meno vivacemente allo stimolo immunizzante che fuori dello stato puerperale.

Non è perciò fuori luogo sospettare, che l' aumento di tossine ovulari, da noi artificialmente prodotto, nell' organismo gestante vaccinato, abbia agito di per sè stesso in modo sfavorevole sulla produzione di sostanze salvanti, e abbia quindi contribuito a ritardare o ad ostacolare la comparsa dei poteri difensivi nel feto.

III.ª SERIE

Anche questa III ª Serie di esperienze sulla trasmissione transplacentare di sostanze salvanti dalla madre al feto, venne instituita sopra coniglie e cavie gravide, associando però al vaccino, sangue defibrinato di animale gravido della stessa specie, per vedere se unendo al materiale vaccinante, alcune sostanze presumibilmente difensive contro i veleni ovulari, si potesse aumentare la capacità dell'organismo gestante di reagire allo stimolo immunitario, dando luogo, ad una trasmissione più cospicua, (dato che trasmissione ci fosse), di sostanze salvanti dalla madre al feto.

CONIGLI

Coniglio N. 1: Femmina, grigia, gr. 3600. (F. gravida, all' inizio, trattata prima con vaccino, poi con sangue defibrinato di coniglia gravida).

17-II-915. - Si vaccina.
23-II » - Si inietta 5 cm.³ di iso-sangue gravidico defibrinato.
23-III » - E' puerpera di pochi giorni. Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discretaquantit à.
anticorpi: discreta quantità.

28-III » - Si infetta con bacilli vivi.
1-IV » - Si sacrifica. All'autopsia: Scarsi tubercoli nella milza. Nulla negli altri organi.

Conigliotto -*a*-.

28-III-915 - Si inietta coi bacilli vivi.

1-V » - Si sacrifica. All'autopsia: Tubercoli nel fegato e nella milza. Gli altri organi sono sani.

Conigliotto -*b*-.

28-III » - Si inocula con tossina.

22-V » - Muore.

Coniglio N. 2: Femmina, collo bianco, dorso grigio, gr. 3600, (F. gravida, all'inizio, trattata contemporaneamente con sangue e con vaccino).

17-II-915. - Iniezione di una miscela di vaccino (dose solita) e di 5 cm³ di iso-sangue gravidico defibrinato.

23-III » - E' puerpera di qualche giorno. Si salassa.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: debole quantità.

28-III » - Si infetta con bacilli vivi.

28-V » - Si sacrifica All'autopsia: Nessuna traccia di tubercolosi

Conigliotto -*c*-.

28 III » - Si infetta con bacilli vivi.

10 IV » - Muore.

Coniglio N. 3: Femmina, color cenere, gr. 3600. (F. gravida, all'inizio, trattata prima con sangue poi con vaccino).

20-II-915. - Iniezione sottocutanea di 5 cm.³ di iso-sangue gravidico defibrinato.

28-II » - Vaccinazione.

24-III » - E' puerpera di pochi giorni Si salassa.

Reazioni immunitarie del siero di sangue:

Precipitazione: debolissima.

Agglutinazione: debole nella diluizione 1:15, evidente nella diluizione 1:10.

Indice opsonico: 1,4.

Reazione Bordet-Gengou. { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: notevole quantità.

Batteriolisi in vitro: Evidente dopo 1 ora, colla diluizione 1:100.

Batteriolisi in vivo: Evidente dopo 1/2 ora, colla diluizione 1:100; dopo 1 ora, colla diluizione 1:1000:

28-III » - Si infetta con bacilli (dose doppia dell'usuale).

1-IV » - Si sacrifica. All'autopsia: Nessuna traccia di tubercolosi.

Conigliotto -*d*-.

Conigliotto -*e*-.

28-III » - Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: discreta quantità

Conigliotto -*f*-.

28-III » - Si infetta con bacilli vivi.

1-IV ». - Sopravvive.

CAVIE

Cavia N. 1: Femmina, tutta bianca, musetto nero, gr. 400. F. gravida all'inizio, trattata prima con sangue gravidico defibrinato, poi con vaccino).

1-III-915. - Iniezione sottocutanea di sangue defibrinato.

9-III » - Vaccinazione.

22-III » - Salasso.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: discreta quantità.

28-III » - Si infetta con bacilli vivi (dose doppia dell'usuale).

29-V » - Si sacrifica. All'autopsia: Deperimento generale; nes) suna traccia di tubercolosi.

Caviotto -*a*-

Caviotto -*b*-.

22-III » Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. / anticorpi: traccie.

Caviotto -*c*-.

1-IV » - Si infetta con bacilli vivi.

29-IV » - Si sacrifica. E' assai deperito, ma all'autopsia non presenta lesioni tubercolari.

Caviotto *-d-*.

1-IV » - Si inocula con tossina.
29-IV » - Sopravvive.

Secondo queste esperienze, tanto le coniglie, quanto le cavie, dimostrerebbero, in seguito al trattamento con vaccino, associato con iso-sangue gravidico defribinato, una attività difensiva contro la tubercolosi, maggiore che in seguito al trattamento con solo vaccino. Difatti negli animali trattati con sangue e vaccino, le reazioni precipitanti ed agglutinanti sono presso a poco uguali a quelle degli animali semplicemente vaccinati, ma invece l'indice opsonico è più elevato, come più elevato è il potere bateriolitico, tanto in vitro che in vivo, come pure maggiore è il contenuto del siero sanguigno in antigeni ed anticorpi, e maggiore la resistenza alla infezione ed all'intossicazione sperimentali

Lo stesso fenomeno si verificherebbe anche nei feti. Inoltre la introduzione di sangue nell'organismo, fatto prima della vaccinazione, si dimostrerebbe più efficace di quella fatta contemporaneamente o successivamente.

Anche per questa 3ª serie di prove, vale quanto ho già detto per la 2ª serie, e cioè che le esperienze sono troppo poche per autorizzarmi a recise affermazioni.

Ma non per questo riesce meno interessante studiare come si comporti l'organismo gestante, di fronte all'impulso immunitario, quando nell'organismo stesso, contemporaneamente alle sostanze salvanti, si introducano veleni o contravveleni ovulari, diminuendo così, od aumentando, in modo sia pure empirico, lo stato autotossico, che è connesso con la gravidanza.

Volendo estendere tali ricerche, alla razza umana, si potrebbero sottoporre alla vaccinazione donne esenti da fenomeni simpatici, e donne con fenomeni simpatici molto accentuati, oppure si potrebbero iniettare a donne gravide, prima o contemporaneamente al vaccino, congrue dosi di sangue defibrinato di altre donne gravide sane.

Difatti, come nulla si oppone, dal punto di vista teorico, a

farci ammettere che gli estratti placentari diminuiscano i poteri di reazione organica, così nulla si oppone a farci pensare che il sangue gravidico defibrinato agisca in senso opposto.

Già parecchi anni fa, e parallelamente ad altri osservatori, io ho avuto agio di constatare il benefico effetto delle iniezioni di sangue defibrinato di donna gestante, sulle anemie gravi legate allo stato puerperale, e ne ho caldeggiato l'applicazione terapeutica anche in altre forme morbose di natura strettamente ostetrica.

Anche nel campo sperimentale, GAIFAMI ha osservato che si può neutralizzare o per lo meno attenuare la tossicità, per il coniglio, degli estratti di placenta umana, facendo su di essa agire del siero di sangue di donna adulta, in determinate proporzioni ed alla temperatura di 37° per 40-60 minuti. Così MORELLI ha notato che l'auto-siero, iniettato sottocute, favorisce la produzione di anticorpi specifici, se si associa al trattamento con materiali a funzione immunizzante.

Infine, lo stesso GAIFAMI, con siero di sangue, ed io, con sangue defibrinato, abbiamo ottenuto reali vantaggi nella cura delle autotossicosi gravidiche.

I risultati delle mie attuali esperienze porterebbero perciò una conferma indiretta a tutte queste ricerche, in quanto essi parlerebbero per un effettivo aumento di attività difensiva nei soggetti gravidi trattati con isosangue gravidico associato a vaccino, in confronto con quelli sottoposti al semplice innesto vaccinico.

I vantaggi di tale associazione, si ripercuoterebbero anche sul feto, perchè nei feti di madri inoculate con sangue e con vaccino, si noterebbe maggior copia di sostanze salvanti, che nei feti di madri iniettate con solo vaccino.

A complemento di queste indagini, converrebbe anche cercare, se tutti i vaccini si comportino nello stesso modo e se lo stesso scopo che si ottiene immunizzando passivamente contro l'intossicazione gravidica (mediante isosangue gravidico defibrinato), l'animale che si vuol vaccinare, non lo si possa anche ottenere aggiungendo all'immunizzazione attiva contro l'infezione tubercolare, un'immunizzazione pure attiva contro l'intossicazione ovulare.

Risponderebbe a questo concetto, l'uso di placenta tubercolosa come antigene a doppio effetto.

I miei tentativi in questo senso, non hanno approdato, come già dissi, ad alcun risultato, anzi hanno fatto rilevare una diminuzione di energia difensiva, nei soggetti trattati con vaccino e antigene placentare, ma non è improbabile, che modificando opportunamente la tecnica di preparazione dei diversi antigeni ovulari e tubercolari, si pervenga a preparare un vaccino capace di attenuare, o addirittura di neutralizzare, nei soggetti vaccinati durante la gestazione, l'azione inibitrice esercitata dallo stato autotossico gravidico, sulla produzione da parte dell'organismo, di sostanze difensive antitubercolari e sulla trasmissione di esse al feto.

B) Trasmissione transplacentare di sostanze a funzione immunizzante, dal feto alla madre.

In questo gruppo di esperienze, compiute in parte presso la R. Maternità di Torino, l'introduzione di sostanze tubercolari a funzione immunizzante, venne fatta, anzichè nelle cavie o nelle coniglie gravide, direttamente nei loro feti, mentre stavano ancora dentro l'utero materno per stabilire se avveniva trasmissione di queste sostanze dal feto alla madre e se dal modo di comportarsi dei feti così trattati e delle rispettive madri, di fronte ai diversi saggi di laboratorio, si poteva trarre qualche elemento di giudizio intorno al genere di immunità (attiva o passiva) eventualmente acquisita dal feto nel corso della vaccinazione:

CONIGLI

Coniglio N 1: Femmina, bianca e nera, gr. 4000. Gravida, 1ª metá gravidanza.

6-III-915. - Vaccinazione diretta di uno dei feti dentro l'utero.
16-III » - Aborto spontaneo.
20-III » - Salasso.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } negativi

24-III-915 - Si infetta con bacilli vivi.
10-IV » - Muore. All'autopsia: Tubercolosi generalizzata

Coniglio N. 2: Femmina grigia, gr. 3800, gravida, 1ª metà, gravidanza.

13-III-915. - Vaccinazione diretta di uno dei feti, dentro l'utero.
21-III » - Aborto spontaneo.
9-IV » - Salasso.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } negativi

Coniglio N. 3: Femmina, nera, gr. 3800, gravida, 1ª metà gravidanza.

1-IV-915. - Inoculazione diretta di uno dei feti dentro l'utero.
6-IV » - Parto prematuro spontaneo di sei feti morti.
17-IV » - Salasso.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } negativi.

10-V » - Si infetta con bacilli vivi.
1-VI » - Si sacrifica. All'autopsia: Tubercolosi generalizzata.

Coniglio N. 4: Femmina, grigia, spalla sinistra bianca, gr. 3350 gravida, 1ª metà gravidanza.

8-IV-915. - Inoculazione diretta di uno dei feti dentro l' utero.
22-IV » - Partorisce sette feti vivi.
26-IV » - Salasso.

Siero di sangue: { antigeni: discreta quantità. / anticorpi: traccie.

29-IV » - Si infetta con bacilli vivi.
29-V » - Si sacrifica. All'autopsia: Tubercolosi splenica ed epatica.

Conigliotto -*a*-.
Conigliotto -*b*-.
Conigliotto -*c*-.

25-IV » - Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } negativi.

Conigliotto -*e*-.

30-IV-915 - Si infetta con bacilli vivi.

8-V » - Muore.

Conigliotto -*f*-.

30-IV » - Si infetta con bacilli vivi.

5-V » - Muore.

Coniglio N. 5: Femmina, grigia, spalle bianche, gr. 3020, gravida, 2ª metà gravidanza.

8-IV-915. - Inoculazione di uno dei feti dentro l'utero.

18-IV » - Parto spontaneo di otto conigliotti vivi.

1-V » - Salasso.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } traccie.

4-V » - Si infetta con bacilli vivi.

1-VI » - Si sacrifica. All'autopsia: Radi tubercoli nella milza.

Conigliotto -*g*-.

Conigliotto -*h*-.

16-IV » - Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni: / anticorpi: } negativi.

Conigliotto -*i*- (alla nascita presentava una piccola zona di infiltrazione sulla natica sinistra).

16-IV » - Si sacrifica.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. / anticorpi: debolissime traccie.

Conigliotto -*l*-.

3-V » - Si infetta con bacilli vivi.

12-V » - Si trova morto.

Coniglio N. 6: Femmina, grigia, stella bianca in fronte, gr. 5270, gravida, 2ª metà gravidanza.

22-IV-915. - Ore 14: Inoculazione diretta in uno dei feti, di una miscela di vaccino e di bleu di metilene.

22-IV-915 - Ore 19: La carta da filtro, sottoposta alla paglia, sulla quale giace l'animale, è macchiata in verde sbiadito.

3-V » - Salasso.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. anticorpi: debolissime traccie.

9-V » - Si infetta con bacilli vivi.

1-VI » - Si sacrifica. All'autopsia: Tubercolosi epatica.

Coniglio N. 7: Femmina, grigia, muso bianco, gr. 2800, gravida, 1ª metà gravidanza.

24-IV-915. - Si inietta direttamente in uno dei feti, una miscela di vaccino e di inchiostro di china.

1-V » - Parto spontaneo di sette conigliotti vivi.

3-V » - Salasso.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. anticorpi: traccie.

7-V » - Si infetta con bacilli vivi, in dose doppia dell'usuale.

2-VI » - Si sacrifica. All'autopsia: Tubercolosi splenica iniziale

Conigliotto -*m*-.

Conigliotto -*n*-.

8-V » Si sacrificano.

Siero di sangue: { antigeni: traccie. anticorpi: negativi.

Conigliotto -*o*-.

8-V » - Si infetta con bacilli vivi.

15-V » - Si trova morto.

CAVIE

L'inoculazione diretta del feto fu pure tentata sopra 4 cavie gravide, verso la metà della gravidanza, ma tutti e quattro questi animali abortirono nelle prime 24 ore consecutive all' innesto. Questo però era sempre stato fatto, previa ampia apertura delle

pareti addominali. Forse, se si fosse anche per le cavie adoperata la stessa tecnica operatoria, usata per i conigli, si sarebbe potuto scongiurare l'aborto. Su queste quattro cavie non furono praticate indagini biologiche.

Risulta da questo gruppo di ricerche che le madri di feti, inoculati direttamente durante la loro vita intrauterina, con materiale tubercolare morto, presentarono nel loro siero di sangue, dopo un tempo variabile da trenta a sessanta giorni, antigeni ed anticorpi specifici, in piccole quantità, e quando vennero infettate sperimentalmente, si dimostrarono più resistenti dei controlli, al bacillo di Koch.

Le reazioni immunitarie in questi animali gestanti, furono un po' più accentuate, quando i loro feti erano stati inoculati in momenti piuttosto precoci del loro sviluppo. Non fu mai possibile identificare, al momento della nascita, quello dei coniglietti, che dentro l'utero era stato vaccinato, perchè riuscirono vani i tentativi di contrassegnare il feto che si inoculava attraverso l'utero, associando al vaccino Maragliano, sostanze coloranti, quali bleu di metilene od inchiostro di china.

In un solo caso, un coniglietto neonato presentava un noduletto di infiltrazione cutanea in una natica ma sarebbe arrischiato attribuire tale infiltrazione alla puntura, traendone argomento per considerare il coniglietto in parola, come quello che aveva subito la vaccinazione. Esso parve reagire positivamente, sebbene assai debolmente, colla fissazione del complemento, però l'esito di una sola prova non ci autorizza a formulare alcun giudizio in merito.

Sebbene le madri, abbiano sovente dimostrato nel loro sangue, la presenza di antigeni e di anticorpi, i feti, eccezione fatta di quello dianzi ricordato, reagirono sempre negativamente al saggio biologico, e ciò è forse dovuto al fatto che io non ho potuto esaminare in modo sistematico tutti indistintamente i feti nati da ciascuna madre.

Assai difficile compito, sarebbe quello di stabilire sulla base di queste esperienze di inoculazione diretta fetale, ed anche sulla base delle ricerche precedenti, se gli anticorpi specifici che si tro-

vano nel feto, nel corso della vaccinazione della madre, siano di origine autoctona, o di provenienza materna.

La deficienza nei feti di madri sane, dei principî naturali necessari per lo stabilirsi dell'immunità antitubercolare; le variazioni di intensità della reazione immunitaria fetale, a loro volta subordinate all'epoca di gravidanza, in cui furono introdotti gli antigeni nella madre; ed infine il comportamento della reazione stessa nel neonato, parlerebbero per un contegno passivo del feto il quale riceverebbe dalla madre le sostanze salvanti, già formate.

Invece la diversità di comportamento di fronte allo stesso stimolo immunitario, di due o più feti, appartenenti alla stessa madre vaccinata; là differenza quantitativa e qualitativa spesso esistente tra gli antigeni e gli anticorpi materni e quelli fetali; la dimostrazione dell'azione regolatrice esercitata dallaplacenta sugli scambi materno-fetali di sostanze immunizzanti; l'assenza di anticorpi, essendo presenti gli antigeni, riscontrata nei feti estratti con taglio cesareo, da madri recentemente vaccinate, ed il cui sangue conteneva anticorpi; e finalmente l'aumento talora assai sensibile dopo la nascita, di queste sostanze, nel siero di sangue dei neonati, all'infuori dell'allattamento materno, consigliano di andare molto cauti, prima di negare senz'altro al feto, almeno per la tubercolosi, la capacità di contribuire direttamente alla produzione di anticorpi specifici, in seguito alla comparsa nel suo organismo, di antigeni tubercolari.

Del resto, gli studiosi sono pressochè concordi nel riconoscere un carattere autonomo alla vita del feto, ed a questo proposito conviene ricordare, con FERRONI, che il feto per se stesso è un organismo con funzioni tutte proprie; che il villo coriale non è barriera passiva per i processi biologici materno-fetali; che allo svolgersi del processo immunitario partecipano in modo intimo ed indissolubile, attività biologiche materne, fetali e placentari. Anche i risultati delle mie ricerche suggerirebbero l'ipotesi che le sostanze specifiche a carattere difensivo reperibili nei feti di madri trattate durante la gravidanza, con materiale tubercolare morto, siano giunte dalle madri nei feti, in parte già elaborate, ed in parte sotto forma di prodotti che hanno stimolato il feto alla produzione diretta di sostanze di reazione.

La continuazione delle ricerche sulla vaccinazione diretta del feto durante la vita intrauterina potrà portare qualche maggior luce sulla questione, sopratutto se si riuscirà o con tatuaggi, o con altri accorgimenti, ad identificare, subito dopo la nascita, il feto che è stato inoculato a traverso le pareti uterine, dentro l'alvo materno e lo si potrà poi seguire nel suo sviluppo ulteriore, all'infuori dell'allattamento materno.

Allo stesso scopo, si potrà anche sperimentare su animali a gravidanza unica, scimmie ad esempio, sia inoculando direttamente il feto dentro l'utero materno, sia estraendo il feto col taglio cesario dopo averne inoculata la madre durante la gravidanza.

*
* *

Le ricerche fin qui esposte non mi permettono per ora di assurgere ad alcuna conclusione.

Trattasi come ben si comprende, di esperienze complesse nella loro esecuzione, e delicate nella loro interpretazione. Forse qualche rilievo un po' più netto potrà sgorgare dal loro confronto, con altre mie prove, ora in corso di attuazione, relative a donne gestanti.

A titolo di semplice riassunto di quanto ho personalmente osservato, mi limito a ricordare che:

L'introduzione di materiale tubercolare morto nell'organismo di conigli e di cavie gravide, ha effetti poco diversi da quelli che si rilevano negli animali della stessa specie, e trattati nello stesso modo, mentre sono fuori di gravidanza.

Tanto negli uni, quanto negli altri, all'innesto di bacilli tubercolari morti, segue a distanza di tempo variabile da uno a tre mesi, la comparsa nel sangue, nel latte ed in alcuni organi e tessuti, di antigeni e di anticorpi specifici, i quali tengono un contegno differente, a seconda che l'inoculazione vaccinica è avvenuta in principio od alla fine della gravidanza, oppure verso la metà di questa, nei primi giorni di puerperio, o fuori dello stato di maternità.

Gli animali inoculati con materiale tubercolare morto, tanto durante la gravidanza che fuori di questa, si dimostrano più re-

sistenti alla infezione ed alla intossicazione tubercolare, degli animali della stessa specie e della stessa taglia, i quali non hanno subito questo trattamento.

I nati di madri inoculate con bacilli morti, sopratutto in epoche precoci di gravidanza, presentano nel loro siero di sangue e negli estratti di alcuni loro organi, antigeni ed anticorpi specifici, biologicamente affini ai materni, ma quantitativamente differenti, ed in parecchi casi mostrano di resistere all'infezione ed all'intossicazione tubercolare, più dei feti nati da madri che non sono state innestate con materiale tubercolare.

Gli antigeni e gli anticorpi in genere, che si rivengono nel latte delle madri inoculate durante la gravidanza con bacilli tubercolari morti, sembrano contribuire ad aumentare il quantitativo di antigeni e di anticorpi del siero di sangue del neonato.

L'associazione di estratti placentari o di sangue gravidico defibrinato all'antigene tubercolare, pare diminuisca od aumenti, rispettivamente, la capacità di quest'ultimo, di indurre nell'organismo nel quale viene introdotto. la comparsa di prodotti specifici antagonisti difensivi

Oltre al passaggio diaplacentare di sostanze a funzione immunizzante di natura tubercolare dalla madre al feto, si può anche provocare sperimentalmente il passaggio delle stesse sostanze da feto alla madre.

BIBLIOGRAFIA

Abbo — Sulle modificazioni della tensione superficiale del siero di tubercolosi. Ann. Ist. Maragliano - vol. IV, fasc. III, p. 105.

Acconci. — Sul potere antitriptico del siero di sangue in gravidanza — Folia Gynaec. — vol. IV, fasc. III.

Achard et Bénard. — Leucoreaction specifique — C. R. Soc. Biologie, 1910. p. 159 e 741.

Agazzi — Rassegna d' Ostetr. e Ginecol. — Gennaio 1915.

Andersen. — Ricerche sulle sostanze anticomplementari. — Centralblatt f. Bakt. — Giugno 1913.

Arloing. — Sur l'indication de la voie digestive pour la vaccination antitubercùleuse etc. — C. R Acc Sciences, Juin 1906, vol. 142, p. 18-25.

Arloing. — Antitubèrcolos vaccination of cattle — The Lancet, December 1908.

Arloing. — Vaccination antituberculeuse sur le boeuf. — Bull. de l' Inst. Pasteur, 15 mars 1910 — C. R. A.Franc. p. l' avanc. d. Scienc. - C. R. Soc. Biol., Mars, 1914.

Ascoli — Sul passaggio delle precipitine dalla madre al feto - Annali d'ostetr. e Ginec., 1902

Ascoli — La sierodiagnosi della tubercolosi bovina - Biochimica e Terapia Sperimentale, Settembre 1912.

Bar — Tubercolosi e gravidanza - Atti del Congresso Internaz. contro la tubercolosi, Roma, Luglio 1912

Bar — Recherches pour servir a l' histoire de l'hydramnios - Paris, 1881, pag. 87-96.

Bar et Renon — Trasmissibilité directe pour la placenta de la tuberculose de la mére au foetus etc. - Ann. de Gyn. et d'Obst. 1895. Vol. XLIV, p. 217.

Basso — Ricerche sui complementi nel sangue di donna sana, mostruante, etc. - La Ginecologia, 1908.

Behring — Deut. Med. Woch, 1903, Nr 39.

Belfanti — La natura dell' immunizzazione Jenneriana - Therapia, Marzo 1915.

Belin — Heredité de l' anaphylaxie serique - C. R. Soc. Biologie, Avril e Juin 1910, p. 800.

Bergeron. — Reaction de Marmoreck - Soc. Biol. 3 Decembre 1909 - Presse Méd., Janvier, 1911.

Bertarelli — Sull'immunizzazione attiva e passiva dei neonati e dei poppanti, per la via dirigente - Zbl. f. Bakt., 1905, vol. 39, Rivista d' Igiene e Sanità pubblica, 1905.

Bertino — Sulla trasmissione di malattie materne ad un solo dei feti, nella gravidanza gemellare- Rassegna d' Ost. e di Ginec. 1905, p. 265-279.

Bertino Sul passaggio delle lisine dalla madre al feto - Archivio Ital. di Ginec. 1905, vol I, p. 97, 123

Bertolini — Comportamento della tensione superficiale nella unione di tossina con antitossina - Ann. Ist. Maragliano, vol. IV, fasc. III, p. 122

Besançon et De Serbonnes — Ètudes sur les anticorps tuberculeux - Journal de Phys. et Path. Gener. 1909.

Besredka — Ètudes sur le bacille tuberculeux et réaction de la fixation du complément - C. R. Acc. Sciences, Mai 1913, C. R. Soc. Biol. Avril, 1914.

Bolaffio — Ricerche comparative sul comportamento dell' indice opsonico nel sangue materno e fetale e nel liquido anniotico e nel latte. Estratto Bollett. R. Acc. di Medic. di Roma, anno XXXIV, fasc. VII-VIII, 1909.

Bolaffio — Sui lipoidi del sangue e sull' azione lipolitica del siero nello stato puerperale - Annali d' Ostet e Ginec. 1913, vol. II, p. 543.

Bordet et Gengou — Sur l' existence de substances sensibilatrices dans la plupart de sérums antimicrobiens - Ann Inst. Pasteur, Mai 1901 - Juin 1908, vol. 24.

Bossi — Sull' ereditarietà della tubercolosi - Ricerche in placente e feti umani - Rassegna d' Ost. e Ginec. 1905.

Bossi — Ricerche sulla trasmissione del bacillo della tubercolosi da madre a feto, in cavie e coniglie gravide, rese tubercolotiche, e sul decorso della infezione tubercolare, nel periodo di gestazione e nel puerperio - Il Policlinico, Sez. Pratica, Ottobre 1903, vol. II, p. 1533.

Broamlen — Iniezione di tubercolina e leucociti — Deut. Arch. f Klin. Chir. 1014, vol 1-2 p. 115.

Bruck - Diagnosi biologica delle malattie d' infezione - Deut. Med. Woch., 1906 N. 24.

Bruni — La reazione di Rivalta in Ostetricia - Annali d' Ost. e di Ginec. 1911, vol. II, p. 101.

Bruschettini — Comunicazione fatta al XVII Congresso Intern di Med., Londra, Agosto, 1913.

Burton — Journal of American Medic Association, 1913, p. 63.

Busse — Citato da Bolaffio.

Calmétte et Guerrin — Recherches experimentelles sur la défence de l' organisme contre l' infection tuberculeuse - Ann. Instit. Pasteur, Septembre 1908, vedi anche: September 1911; Février 1913; Fèvrier 1914.

Calmette et Massol — Deviation de l' alexine avec les antigénes et les anticorps tuberculeux - C. R. Soc. Biol. Nov. 1909, vedi anche: Juillet 1911, Juillet 1912; Juin 1914; Ann. Inst. Pasteur, Avril 1914.

Capaldi — Sulla diffusione delle tifo agglutinine in gravidanza - Archivio di Ost. e Ginecol. 1904, vol. XI, N 8.

Castruccio — Immunizzazione antitubercolare per via gastrica — Ann. Ist Maragliano, vol. I, fasc. V, pag. 278.

Cavagnis — La sieroreazione di Rivalta in Ostetricia - Annali di Ostet. e Ginec. 1912, vol. II, p. 219.

Cerrutti — Tubercolosi e gravidanza - La Ginecologia Moderna, 1911, fasc. VI.
Charrin et Gley — Archiv. de Physiol, vol. IV, 1910.
Citron — Trattato di Immundiagnosi e di Immunterapia.
Civalleri - Ricerche sulla precipito-diagnosi di materiale tubercolare - Rivista critica di Clin. Medica, 1915, N. 16.
Connio — La vaccinazione antitubercolare Maragliano - Lavori del Congresso di Medicina Interna, Ottobre 1914.
Costa — La cutireazione nei neonati di madri tubercolose - Rassegna d' Ostet. e Ginec., Febbraio 1910, N. 2.
Costantini — Il valore del metodo di Much per la colorazione dei bacilli tubercolari - Riforma Medica, Anno XXVIII, N. 41.
Costantini e Bottero — Sulla tubercolosi sperimentale del fegato — Annali Ist. Maragliano, Settembre 1918, fasc. 2.
Costantini e Sivori — Sulla produzione di alcuni veleni tubercolari e loro proprietà biologiche — Annali Ist. Maragliano - Vol. VI, fasc. 6, p. 394.
Cova — Sull' origine di una reazione chimica particolare del sangue delle gravide - Annali di Ostet. e Ginec., 1913, vol. II, p. 495.
Corazza — Citato da Martelli.
De Blasi — Sulla natura delle aggressine e sul loro comportamento rispetto alle opsonine. Ann. d'Igiene Speriment., 1907.
De Blasi — La vaccinazione antitubercolare in gravidanza - Il Policlinico - Sez Pratica, 1914.
De Blasi — I progressi della Ginec. Italiana - Gynaek, Rundschau, 1913 N.23-24.
De Blasi — Sul passaggio transplacentare di germi e di anticorpi dalla madre al feto - In corso di pubblicazione.
De Bonis e Benga — Sul metodo di Marmoreck - La Riforma Medica, Luglio 1911, vol. 27.
Decio — I fermenti protettivi dell' organismo per la diagnosi di gravidanza e per lo studio di alcune questioni collaterali - Annali di Ost. e Ginec. 1913, vol. II, p. 412.
Delille — Deviation du complement par les serums antitoxiques en présence des toxines correspondentes — C. R. Soc. Biol 1903 - Semaine Méd. Sept. 1909 — C. R Soc. Biol., Mai 1909 e 1912, vol. 71.
Di Mattei — Sulla trasmissione di alcune immunità artificiali dalla madre ai feti - Boll. R. Accad. di Med., Roma, 1887-88, p. 368-386.
Dogliotti — Giornale R. Acc. di Med. di Torino, Giugno 1887, N. 6.
Duquaire — Ricerche cliniche e sperimentali intorno alla vaccinazione antitubercolare - Comunicazione al Congresso Medico di Lione, Ottobre 1911, Provence Médicale, Febbraio 1911.
Eber — Ricerche sperimentali sulla tubercolosi - 1905, vol. III, p. 4.
Ehrlich — Sull' immunità acquisita con l' eredità e con l' allattamento. - Zschr. f. Gyn., 1892.
Epifanio — La sintesi dell' ambocettore tubercolare, per la siero-diagnosi della tubercolosi - Ann. di Clinica Medica 1911, vol. 1.

Fadjean, Edwards and Minett — Experiments regarding the vaccination of cattle against tubercolosis by intravenous infection of tubercle bacilli of the human and avian types - Journ. of Compared Pathologie and Therapie, December, 1913.

Fedeli — Sulla presenza di anticorpi specifici tubercolari nel siero di sangue di nati da animali vaccinati con materiale Maragliano - Ann. Ist. Maragliano vol. III, fasc. 6, pag. 377.

Ferroni — Fisiopatologia generale della gravida - Edit. F. Vallardi, Milano, 1914

Figari — Sul passaggio delle agglutinine ed antitossine tubercolari nel latte e loro assorbimento per via del tubo gastro-enterico - Ann. Ist. Maragliano, vol. 1, fasc. 2, pag. 97; fasc 3, pag 139.

Flamini — Le opsonine della prima infanzia - Rivista di Clinica Pediatrica, Anno VI, N. 8.

Foà e Bordoni-Uffreduzzi — Sull' azione abortiva del meningococco e suo passaggio dalla madre al feto - Riforma Medica, 1887, N. 39.

Foà e Koch — Sulla presenza di sostanze nel siero di bambini tubercolosi, che fissano il complemento, con la tubercolina. Biochimica e Terapia sperimentale, 1910, anno II, p. 11.

Fornario — Nuove osservazioni sull' attivazione del veleno del cobra - Ann. Ist. Maragliano, vol. IV, fasc 5 6, pag. 300.

Francioni e Monabuoni — Contributo alla tecnica della deviazione del complemento, nella tubercolosi - Il Policlinico, febbraio 1912.

Friedmann — Immunizzazione contro la tubercolosi - Deut. Med. Woch., 1903, N. 50, 1904 N. 5 e N. 46

Frugoni — Studi sul siero del sangue dei tubercolosi e sugli essudati delle cavità sierose, a mezzo della fissazione del complemento - Il Policlinico, Marzo 1910.

Gaifami — Sulla tossicità degli estratti acquosi placentari, e sull' azione svelenante esercitata su di essi dal siero di sangue - Rassegna d' Ost. e Ginec. Marzo, 1914.

Gaifami — Sulla sieroterapia delle autointossicazioni gravidiche - Annali d'Ost. e Ginec. 1912, vol. II, p. 763.

Gaifami — Di una reazione chimica del sangue nello stato puerperale e sul neonato - Annali di Ostetr. e Ginec. 1912, vol. II, p. 718.

Gardi — Di alcune sostanziali innovazioni da introdurre nella tecnica del metodo della fissazione del complemento - Clinica Medica Italiana, 1911.

Gardi e Sivori - Tecnica per la valutazione del potere anticorpo di un siero immune bacterico - Ann. Ist. Maragliano, 1911, vol. V, p. 149.

Gaucher, Salin et Bricourt — Un tissu riche en granulations tuberculeuses peut il servir d' antigene dans le réaction de deviation du complement ? - C. R. Soc. Biol. 1912, v. 73.

Gillaud — The production of artificiel immunity against tuberculosis in domestic animals - Americ. Veterinary Review - June 1914.

Ghedini — Citato da Maragliano.

Goggia — Intorno all'azione esplicata dai bacilli tubercolari coltivati in sacchetti di collodio nel peritoneo del cane, sopra i poteri difensivi del siero. Ann. Ist. Maragliano, vol. II, fasc. 4, p. 244; vol. II, fasc. 6, pag. 383.

Goupil et Moussu — Etude sur l'action immunisante des derivés bacillaires chlorés — C. R. Acc. Sciences, 6 Julliet, 1908.

Grillo — Rapporti tra feto e madre Congresso Ostetrico, Berlino, 13 Settembre 1912, vol. II, p. 521.

Guicciardi — Ricerche biologiche sul liquidò amniotico - Ann. di Ost. e Ginec. 1912, vol. I, p. 1.

Guinard et Hochwelcher — Recherches sur le passage des substances solubles du foetus à la mère - C. R. Soc. Biologie, 1898, p. 1183.

Gusserow. — Arch. f. Gyn., vol. XIII, p. 67.

Hanot e Marfan — Citati da Rizzatti

Heymans — Proprietà fisiologica del sangue di gravida e di neonato e rapporti tra sangue materno e fetale - Folia Haemat 1906, vol. 3.

Heymans — La vaccination antituberculeuse chez le bovides - Semaine Médic, 27 Janvier 1907; vedi anche 4 Mars 1908; 30 Juin 1909; 2 Fevrier 1910 e Acc. Roy. de Sciences de Belgique, 22 Fèvrier 1913.

Jacopson — Sur le diagnostic de la tuberculose per la déviation du complément, selon la methode de Marmoreck - C. R. Soc. Biol. Janvier 1920.

Jemma — Citato da Maragliano.

Jousset — Les sérums antitubercolineux. Precipito-diagnostic de la tubercolose C. R. Soc. Biol. CXLIX, 1909.

Klimmer Vaccinazione preventiva del vitello - Berl. Tierarztl. Woch. Aprile 1908.

Klinkert et Citron — Constatazione biologica di sostanze lipoidi, nel sangue e nell'orina di tubercolotici e loro significato - Riforma medica, Ottobre 1910.

Kraus e Graff — Azione del siero placentare o gravidico sulle cellule del cancro umano - Wien. Klin. Woch, 1912, N. 6.

Kreidl e Mandl — Sul passaggio di immunemolizine dal feto alla madre - Ibidem 1914.

Krukenberg — Sull'origine del liquido amniotico - Arch. f. Gyn., vol. 22 p. 23, 183.

Laganà — La Clinica Oculistica - Luglio, Dicembre 1914.

Lagriffoult et Pagès — Sur le passage de l'agglutinine de la mère au foetus dans le cas de tuberculose maternelle — C. R. Soc. Biol. 1903, p. 1115-1116,

Lannelongue et Achard — Sur le passage de la propriete agglutinante, à travers la placenta - C. R. Soc. Biol. 1897, p. 225.

Lanza — Note pratiche sulla vaccinazione antitubercolare - Ann. Ist. Maragliano, vol. I, fasc. 3, pag. 185.

Levi G. — Anemia progressiva e gravidanza - Folia Gynaec., 1910.

Levi G. — Emoterapia dell'iperemesi - La Ginecologia Moderna, Gennaio-Aprile 1915.

Lignières — Sur la vaccination de bovides contre la tuberculose - Bull. Soc. Med. Veterin., 1907, vol. 84.

Livierato — Sulla presenza e sulla dimostrazione di sensibilizzatrici tubercolari, negli estratti di ghiandole linfatiche scrofolose umane - Gazz. degli Ospedali, Luglio 1910.

Lo Monaco e Panichi — Agglutinazione nel sangue dei malarici - Zbl. f. Allg. Path. 1900.

Lucciarini — Citato da Maragliano.

Maffucci — Sulla patologia embrionale infettiva - Il Policlinico, 1894, p. 33.

Maffucci — Contributo sperimentale alla patologia delle infezioni nella vita embrionale - Riv. Internaz. Med. 1887, vol. IV.

Manfredi — Modificazione della crasi sanguigna nel decorso della vaccinazione antitubercolare - Ann Ist. Maragliano, vol. VIII, fasc. 4, p. 225.

Manfredi — Ipersensibilità ai veleni tubercolari dopo vaccinazione antitubercolare - Lavori del Congresso di Medicina Interna di Genova, Ottobre 1914 - Ann. Ist. Maragliano, vol. VIII, fasc. I, p. 51.

Manna — Annali di Ostetricia e Ginecologia - 1914, vol. I, p. 100.

Maragliano — Conferenza Madrid. 1903.

Maragliano — Conferenza Filadelfia, 1903.

Maragliano — Lezione di chiusura per l'anno accademico 1913-1914 - La Cronaca della Clinica Medica di Genova, Agosto 1914.

Maragliano — Vaccinazione Behring e tubercolosi latente ganglionare - Gazzetta degli Ospedali, Luglio 1906.

Marmoreck — Diagnostic de la tuberculose, par le methode de la déviation du complément - Presse Medicale, 6 Janvier 1909.

Martelli - La vaccinazione antitubercolare dal punto di vista del suo valore profilattico verso l'individuo e verso la sua discendenza - Tesi di Laurea, Anno Scolastico 1915-16, Genova.

Marzagalli e Maragliano — Azioni delle correnti ad alta frequenza sui veleni tubercolari e sul siero antitubercolare - Ann. Istit. Maragliano, vol. VI, fasc. 5, p. 315.

Milani — Azione del radio sulle culture di bacillo tubercolare - Gazzetta Intern. di Med. Chir. e Igiene, 1915. N. 8.

Morelli — Valore dell'autosieroterapia nell'infezione tubercolare - Ann. Ist. Maragliano, vol V, Maggio-Agosto 1911, p. 181.

Morelli — Azione dei bacilli tubercolari sterilizzati, iniettati sotto la cute degli animali in dosi massive - Ann. Ist. Maragliano, vol. VI, fasc. 4, p. 298.

Morelli — Di un nuovo metodo di precipito-diagnosi nella infezione tubercolare. Ann Ist. Maragliano, vol. V, Maggio Agosto 1911, pag. 196.

Moreschi — Sulle vaccinazioni antitifiche ed anticoleriche nel nostro esercito - Il Policlinico (Sez. Pratica), Marzo 1916, p. 337.

Moro — Contenuto in complemento del siero, nell'allattamento - Munch. Med. Woch 1907, p. 2172.

Moussu — Le bilan actuel de la vaccination et sérotherapie antituberculeuse. Recueil de Med. Veter. 15 Novembre 1906.

Moussu — Cultures de tuberculose in vivo et vaccination antituberculouse - C. R. Acc. des Sciences, 25 Novembre 1907, vol. 145.

Muller et Suess — Ricerche sierologiche sulla tubercolosi - Riforma Med. 1910.

Pagano — Citato da Pirani.

Palmelli — Il valore delle chenotossine nei processi d' immunità — La Riforma Medica 1914, N. 41.

Pestalozza G. D — La reazione di Rivalta in gravidanza - Annali d' Ostet. e Ginec. 1911, Vol. I, p. 39.

Pirani — Tubercolosi e Gravidanza - Tesi di Libera Docenza - Pisa 1914.

Porcelli e Titone — Alcuni esperimenti d' immunizzazione colle sostanze grasse del bacillo tubercolare e coi corpi batterici sgrassati - Biochimica e Terapia Sperimentale, 1914, vol. 12.

Preyer - Citato da Rizzetti.

Raineri - Sui passaggi feto-materni di sostanze solubili, a feto vivo ed a feto morto, durante la gravidanza - Rassegna d' Ostet. e Ginec. 1901.

Rappin — Experiences de vaccination de bovides contre la tuberculose - Ann. de l' Inst. Pasteur, Sept. 1909.

Rappin — Vaccination antituberculeuse chez le cobaye - C. R. Acc. Sciences, Janvier, 1911 - Semaine Méd. 29 Janvier 1913.

Ravà — Intorno al passaggio delle agglutine tifiche dalla madre al feto, attraverso la placenta, e dal latte della nutrice al sangue del lattante - Bollettino Scienze Med. Bologna, Giugno 1906.

Resinelli — Sul potere emolitico ed emoagglutinante del liquido amniotico - Atti Soc. Ital. Ost. e Ginec. 1901

Ricci — Citato da Martelli.

Rizzatti - L' origine normale del liquido amniotico e l' eziologia del polidrannios - Tesi di Libera Docenza - Società Anonima Cattolica Tipografica, Modena, 1914.

Roemer — Passaggio intra ed extrauterino di antitossine dalla madre nei suoi discendenti - Berl. Klin. Woch, 19o1.

Roemer — Immunizzazione contro l' infezione tubercolare con bacilli tubercolari - Beitr. z. Klin. Tub. 1911, vol. 22, N. 3.

Romanelli — Il potere opsonico del siero di sangue di soggetti tubercolosi — Ann. Ist. Maragliano, vol. II, fasc 3, p. 174.

Romanelli e Morelli — Sulle proprietà immunizzanti degli estratti di polmone umano tubercoloso - Ann. Ist. Maragliano, vol. V.

Roncagliolo — Citato da Martelli.

Rubino — Osservazioni ematologiche sulla vaccinazione antitubercolare. — Gazzetta Internaz Scienze Mediche, 1914, N. 26.

Sambalino — Reazione di Winkler-Schultze in gravidanza - Annali di Ostet e Ginec. 1911, vol. II, p 534.

Sanarelli — L' evoluzione biologica della tubercolosi, nella specie umana - Comunicazioni ai signori Medici - Edit. Carlo Erba, Milano, 1914.

Santi — Citato da Ferroni.

Savory — Citato da Rizzetti.

Schenk - Contenuto biologico del sangue materno e fetale e sostanze difensive del latte - Mschr. f. Geb. u. Gyn. 1904, vol. 19.

Schutz — Specific Treatment of Tubercolosis - The Lancet, 16 Juni, 1910.

Segale — Ricerche anatomo-patologiche e biochimiche su tre feti di colerose - Pathologica, 1913.

Sivori - Esaurimento del potere antigene della polpa bacillare, verso i principii contenuti nel siero antitossico e batteriolitico - Ann. Ist. Maragliano, 1912, vol. 6.

Sivori — Sulla vaccinazione antitubercolare - Boll. Ist. Maragliano, Febb. 1915.

Sivori — Sulla immunizzazione per via gastrica - Bollett. Istituto Maragliano, Maggio, 1915.

Sivori — Sulla presenza di principii difensivi nel latte di animali immunizzati contro la tubercolosi - La Pediatria, 1915, N. 4

Sivori, Caffarena, Corradi — Sierodiagnosi tubercolare col metodo biologico della fissazione del complemento — Ann. Ist. Maragliano, vol. VI, fasc. 3. p. 200.

Sivori e Costantini — Metodica del controllo dei sieri antitubercolari - Ann, Ist. Maragliano, vol. VII, fasc. 4, p. 249.

Sivori e Gardi — Il dosaggio degli anticorpi e rispettivamente degli antigeni. Cronaca Clinica Medica di Genova, 1910.

Sivori e Gardi — Sul nuovo metodo di analisi biologica - Il metodo dell'esaurimento frazionato — Ann. Ist. Maragliano, 1910, vol. 4.

Smith — The vaccination of cattle against tuberculosis - Journ. of med Research, 3 Juni 1908.

Soli — Ricerche comparative sul potere emolitico del siero di sangue materno e fetale - Annali di Ost. e Ginec. 1907.

Spangler — Potere emolitico ed antiemolitico del liquido amniotico nelle gravidanze patologiche - Atti Soc. Ital. di Ost. e Ginec. 1907, vol. XIII.

Tallo — La ricerca dei granuli di Much, nelle forme di tubercolosi chirurgica ed il loro valore diagnostico e biologico - Gazzetta Internaz. di Med. Chir. e Igiene, 1915, N. 16.

Tessier — Therapeutique des maladies tuberculeuses au moyen des sérums spécifiques - Congresso Internaz. contro la Tubercolosi, Roma, 1912.

Tizzoni e Cattani — Sulla trasmissibilità del colera dalla madre al feto. Zbl. f. Deut. Med. Wiss. 1887, vol. XXVI, p. 131.

Torngreen — Etudes experiment, sur le voes qu'empruntent les substances contenues dans le liquide amniotique pour retourner etc. - Archiv. de Tocologie 1888, vol XV, p. 453.

Turton and Appleton — The relative opsonic power of the mothers blood serum and milk - British Med Journ. 13 Aprile 1907, p. 865.

Vallée — Immunisation antituberculeuse - Annales de l'Inst. Pasteur, Août-Sept, Oct. 1910 - C. R. Societé de Biologie, 1909.

Vallée e Finzi — Sulla precipito-diagnosi della tubercolosi e sulla proprietà

del siero di cavallo iperimmunizzato contro questa infezione - C. R. Soc. Biologie, Febbraio 1910.

Vallée et Rossignol — Experiences sur la vaccination antituberculeuses des bovides — Bull. Soc. Med. Veterin. Prat. Mars-Oct. 1906.

Vaillard — Sur l'hérédité de l'immunité acquise · Ann de l' Inst. Pasteur, 1896

Webb — Journal of the American Medical Association, 1913, p. 63.

Weber e Titze — Immunizzazione del bue, contro la tubercolosi - Lavori sulla tubercolosi, 1907, p. 2.

Wiel e Nakajána — Obbiezioni alla teoria di Wassermann e Bruck sulla presenza dell'antitubercolina negli estratti di organi, 1908.

Wiener — Sull'origine del liquido amniotico — Arch. f. Gyn - Vol. 17. p. 24 vol. 23, p. 183.

Wright — An experimental investigation of the rhole of the blood fluids in connection with phagocytosis - Proceeding of the Roy. Soc. London, volume LXXII, 1904.

Zedda - La riattivabilità dei sieri e le sostanze cotostabili nell'auto ed isoemolisi materna e fetale · La Ginecologia 1906, p. 602.

Zedda — Ricerche sull' autoemolisi materna e fetale · Annali d'Ostetricia e Ginec. 1906.